

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 3 月 11 日 (11.03.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/020462 A1(51) 国際特許分類⁷: C07K 7/08, A61K 38/00,
A61P 19/02, 29/00, 35/00, 35/04, 43/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/010753

(22) 国際出願日: 2003 年 8 月 26 日 (26.08.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-247843 2002 年 8 月 27 日 (27.08.2002) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品
工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES,
LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府 大阪市 中央区道修
町四丁目 1 番 1 号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 藤井 信孝 (FU-
JII, Nobutaka) [JP/JP]; 〒520-0248 滋賀県 大津市 仰
木の里東 6 丁目 3-5 Shiga (JP). 玉村 啓和 (TAMA-
MURA, Hirokazu) [JP/JP]; 〒604-0014 京都府 京都市
中京区釜座通二条上 大黒町 7 0 4-3 Kyoto (JP).
堀 晃 (HORI, Akira) [JP/JP]; 〒662-0965 兵庫県 西宮市
郷免町 1-2 5 Hyogo (JP).(74) 代理人: 高橋 秀一, 外 (TAKAHASHI, Shuichi et al.);
〒532-0024 大阪府 大阪市 淀川区十三本町 2 丁目
1 7 番 8 5 号 武田薬品工業株式会社大阪工場内 Os-
aka (JP).(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO,
NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).添付公開書類:
— 国際調査報告書2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: CXCR4 ANTAGONIST AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: CXCR4 拮抗薬およびその用途

(57) Abstract: It is intended to provide a preventive and/or a remedy for cancer and rheumatoid arthritis which contains a peptide having a CXCR4 antagonism, its amide, its ester or its salt. Also, a novel peptide having a CXCR4 antagonism, its amide, its ester and its salt are provided.

(57) 要約: 本発明は、CXCR4 拮抗作用を有するペプチドまたはそのアミド、そのエステルもしくはその塩を含
有する、癌ならびに慢性関節リウマチの予防及び/又は治療剤を提供する。本発明はまた、CXCR4 拮抗作用
を有する新規ペプチドまたはそのアミド、そのエステルもしくはその塩を提供する。

明 細 書

CXCR 4拮抗薬およびその用途

5 技術分野

本発明は、CXCR 4拮抗作用を有する化合物、並びにそれを含有する癌および慢性関節リュウマチの予防及び／又は治療剤に関する。

背景技術

- 10 多くのホルモンや神経伝達物質は細胞膜に存在する特異的なレセプターを通じて生体の機能を調節している。これらのレセプターの多くは共役しているグアニンヌクレオチド結合性蛋白質 (guanine nucleotide-binding protein、以下、G蛋白質と略称する場合がある) の活性化を通じて細胞内のシグナル伝達を行う。また、これらのレセプターは、7個の細胞膜貫通領域を有する共通した構造をもっていることから、G蛋白質共役型レセプター、
15 あるいは7回膜貫通型レセプター (7 TMR) と総称される。

このようなG蛋白質共役型レセプター蛋白質の一つとして、CXCR 4遺伝子によってコードされるヒト型レセプター蛋白質 [Journal of biological chemistry, 第 273 巻, 第 4754 頁 (1998 年)] が知られている。

- 20 また、上記のCXCR 4に対するリガンドとして機能する生理活性ペプチドとして、CXCL 12/SDF-1 [Science, 第 261 巻, 600-603 頁 (1993 年)] が知られている。

- 藤井 [国際公開第 02/20561 号パンフレット (2003 年 3 月 14 日)] には、CXCR 4に対して拮抗作用を有するペプチド性化合物が開示
25 されており、それらの化合物が抗HIV活性を有することが記載されている。

癌の転移は患者の余命を左右する重要な要素である。CXCR 4は乳癌などにおいてその発現が亢進し、さらに転移先の臓器 (リンパ節、肺、肝臓および骨) においてそのリガンドであるCXCL 12/SDF-1 α の発現が亢進していることが報告されている [Nature, 第 410 巻, 50-56 頁 (2001

年)]。また、慢性関節リウマチは、CD 4 陽性 T 細胞の関節腔液への浸潤がその病状の進展に影響を与える。慢性関節リウマチ患者の関節腔液内の CD 4 陽性記憶 T 細胞において CXCR 4 遺伝子発現が亢進し、関節滑膜組織において CXCL 12 / SDF-1 α 遺伝子発現が亢進していることが報告されている [Journal of Immunology, 第 165 巻, 6590-98 頁 (2000 年)]。

本発明は、CXCR 4 拮抗作用を有する化合物を用いた新規な癌ならびに慢性関節リウマチの予防及び／又は治療手段の提供を目的とする。また、本発明は、癌ならびに慢性関節リウマチの予防及び／又は治療活性を有する新規化合物、特に共通の構造を有する種々のオリゴペプチドを提供する。

発明の開示

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、これまでエイズの化学療法剤として有効であると考えられてきた CXCR 4 拮抗作用を有する化合物が、転移を含む癌ならびに慢性関節リウマチの予防及び／又は治療に有効であることを見出し、さらに研究を行った結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

(1) 下記式 (I a)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
A1-A2-A3-Cys-Tyr-A4-A5-A6-A7-A8-A9-A10-Cys-A11 (I a)

(式中、

A 1 は、N 末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン若しくはグルタミン酸残基であるか、又は欠失しており；

A 2 は、A 1 が N 末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン若しくはグルタミン酸残基である場合には、アルギニンまたはグルタミン酸残基を表し、A 1 が欠失している場合には、N 末端で誘導体化されていてもよいアルギニン又はグルタミン酸残基を

表し；

A 3 は、芳香族アミノ酸残基を表し；

A 4、A 5 及び A 9 は、独立して、アルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン又はグルタミン酸残基を表し；

- 5 A 6 は、プロリン、グリシン、オルニチン、リジン、アラニン、シトルリン、アルギニン又はグルタミン酸残基を表し；

A 7 は、プロリン、グリシン、オルニチン、リジン、アラニン、シトルリン又はアルギニン残基を表し；

- 10 A 8 は、チロシン、フェニルアラニン、アラニン、ナフチルアラニン、シトルリン又はグルタミン酸残基を表し；

A 10 は、シトルリン、グルタミン酸、アルギニン又はリジン残基を表し；

A 11 は、C末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、グルタミン酸、リジン又はシトルリン残基を表し；

- 15 上記式中、C y s はシステイン残基を表し、T y r はチロシン残基を表し、4位と13位のシステイン残基はジスルフィド結合により連結していてもよく、アミノ酸はL体であってもD体であってもよい)で示されるペプチド又はその塩を含有してなる、癌または慢性関節リウマチの予防及び／又は治療剤、

- 20 (2) 上記式 (I a) において、

A 1 は、N末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、シトルリン、アラニン若しくはグルタミン酸残基であるか、又は欠失しており；

- 25 A 2 は、A 1 がN末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、シトルリン、アラニン若しくはグルタミン酸残基である場合には、アルギニンまたはグルタミン酸残基を表し、A 1 が欠失している場合には、N末端で誘導体化されていてもよいアルギニン又はグルタミン酸残基を表し；

A 4 は、アルギニン、シトルリン、アラニン又はグルタミン酸残基を表し；

A 5 は、アルギニン、シトルリン、アラニン、リジン又はグルタミン酸残

基を表し；

A 6 は、リジン、アラニン、シトルリン又はグルタミン酸残基を表し；

A 7 は、プロリン又はアラニン残基を表し；

A 8 は、チロシン、アラニン又はグルタミン酸残基を表し；

5 A 9 は、アルギニン、シトルリン又はグルタミン酸残基を表し；

A 10 は、シトルリン又はグルタミン酸残基を表し；

A 11 は、C末端で誘導体化されていてもよいアルギニン又はグルタミン酸残基を表すものである、(1) 記載の予防及び／又は治療剤。

(3) 下記式 (I b)

10 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
 B1-B2-B3-Cys-Tyr-B4-B5-B6-B7-B8-B9-B10-Cys-B11 (I b)

(式中、

B 1 は、N末端で誘導体化されていてもよいグルタミン酸残基であるか、又は欠失しており；

15 B 2 は、B 1 がN末端で誘導体化されていてもよいグルタミン酸残基である場合には、アルギニンまたはグルタミン酸残基を表し、B 1 が欠失している場合には、N末端で誘導体化されていてもよいアルギニン又はグルタミン酸残基を表し；

B 3 は、芳香族アミノ酸残基を表し；

20 B 4、B 5 及び B 9 は、独立して、アルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン又はグルタミン酸残基を表し；

B 6 は、プロリン、グリシン、オルニチン、リジン、アラニン、シトルリン、アルギニン又はグルタミン酸残基を表し；

25 B 7 は、プロリン、グリシン、オルニチン、リジン、アラニン、シトルリン又はアルギニン残基を表し；

B 8 は、チロシン、フェニルアラニン、アラニン、ナフチルアラニン、シトルリン又はグルタミン酸残基を表し；

B 10 は、シトルリン、グルタミン酸、アルギニン又はリジン残基を表し；

B 1 1 は、C末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、グルタミン酸、リジン又はシトルリン残基を表し；

上記式中、C y s はシステイン残基を表し、T y r はチロシン残基を表し、4位と13位のシステイン残基はジスルフィド結合により連結していてもよく、アミノ酸はL体であってもD体であってもよい) で示されるペプチド又はその塩、

(4) B 1 は、N末端で誘導体化されていてもよいグルタミン酸残基である、

(3) 記載のペプチド又はその塩。

(5) 下記式 (I c)

10 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
C1-C2-C3-Cys-Tyr-C4-C5-C6-C7-C8-C9-C10-Cys-C11 (I c)

(式中、

C 1 は、N末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン若しくはグルタミン酸残基であるか、又は欠失
15 しており；

C 2 は、C 1 がN末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン若しくはグルタミン酸残基である場合には、グルタミン酸残基を表し、C 1 が欠失している場合には、N末端で誘導体化されていてもよいグルタミン酸残基を表し；

20 C 3 は、芳香族アミノ酸残基を表し；

C 4、C 5 及びC 9 は、独立して、アルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン又はグルタミン酸残基を表し；

C 6 は、プロリン、グリシン、オルニチン、リジン、アラニン、シトルリン、アルギニン又はグルタミン酸残基を表し；

25 C 7 は、プロリン、グリシン、オルニチン、リジン、アラニン、シトルリン又はアルギニン残基を表し；

C 8 は、チロシン、フェニルアラニン、アラニン、ナフチルアラニン、シトルリン又はグルタミン酸残基を表し；

C 1 0 は、シトルリン、グルタミン酸、アルギニン又はリジン残基を表

し；

C 1 1 は、C末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、グルタミン酸、リジン又はシトルリン残基を表し；

- 5 上記式中、C y s はシステイン残基を表し、T y r はチロシン残基を表し、
4 位と1 3 位のシステイン残基はジスルフィド結合により連結していてもよく、アミノ酸はL体であってもD体であってもよい) で示されるペプチド又はその塩、

(6) 下記式 (I d)

- 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
10 D1-D2-D3-Cys-Tyr-D4-D5-D6-D7-D8-D9-D10-Cys-D11 (I d)

(式中、

D 1 は、N末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン若しくはグルタミン酸残基であるか、又は欠失しており；

- 15 D 2 は、D 1 がN末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン若しくはグルタミン酸残基である場合には、アルギニンまたはグルタミン酸残基を表し、D 1 が欠失している場合には、N末端で誘導体化されていてもよいアルギニン又はグルタミン酸残基を表し；

- 20 D 3 は、芳香族アミノ酸残基を表し；

D 4 は、グルタミン酸残基を表し；

D 5 及びD 9 は、独立して、アルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン又はグルタミン酸残基を表し；

- 25 D 6 は、プロリン、グリシン、オルニチン、リジン、アラニン、シトルリン、アルギニン又はグルタミン酸残基を表し；

D 7 は、プロリン、グリシン、オルニチン、リジン、アラニン、シトルリン又はアルギニン残基を表し；

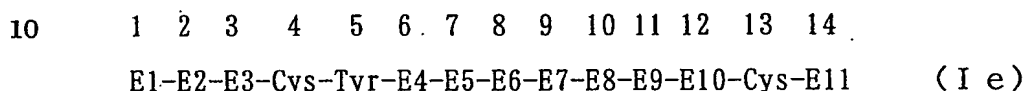
D 8 は、チロシン、フェニルアラニン、アラニン、ナフチルアラニン、シトルリン又はグルタミン酸残基を表し；

D 1 0 は、シトルリン、グルタミン酸、アルギニン又はリジン残基を表し；

D 1 1 は、C末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、グルタミン酸、リジン又はシトルリン残基を表し；

- 5 上記式中、C y s はシステイン残基を表し、T y r はチロシン残基を表し、4位と13位のシステイン残基はジスルフィド結合により連結していてもよく、アミノ酸はL体であってもD体であってもよい) で示されるペプチド又はその塩、

(7) 下記式 (I e)



(式中、

- E 1 は、N末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン若しくはグルタミン酸残基であるか、又は欠失
15 しており；

- E 2 は、E 1 がN末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン若しくはグルタミン酸残基である場合には、アルギニンまたはグルタミン酸残基を表し、E 1 が欠失している場合には、N末端で誘導体化されていてもよいアルギニン又はグルタミン酸残基を
20 表し；

E 3 は、芳香族アミノ酸残基を表し；

E 4 及びE 9 は、独立して、アルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン又はグルタミン酸残基を表し；

E 5 は、アルギニン又はグルタミン酸残基を表し；

- 25 E 6 は、プロリン、グリシン、オルニチン、リジン、アラニン、シトルリン、アルギニン又はグルタミン酸残基を表し；

E 7 は、プロリン、グリシン、オルニチン、リジン、アラニン、シトルリン又はアルギニン残基を表し；

E 8 は、チロシン、フェニルアラニン、アラニン、ナフチルアラニン、シ

トルリン又はグルタミン酸残基を表し；

E 1 0 は、シトルリン、グルタミン酸、アルギニン又はリジン残基を表し；

5 E 1 1 は、C末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、グルタミン酸、リジン又はシトルリン残基を表し；

上記式中、C y s はシステイン残基を表し、T y r はチロシン残基を表し、4位と13位のシステイン残基はジスルフィド結合により連結していてもよく、アミノ酸はL体であってもD体であってもよい)で示されるペプチド又はその塩、

10 (8) E 5 は、グルタミン酸残基を表す、(7)記載のペプチド又はその塩、(9)下記式(I f)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

F1-F2-F3-Cys-Tyr-F4-F5-F6-F7-F8-F9-F10-Cys-F11 (I f)

(式中、

15 F 1 は、N末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン若しくはグルタミン酸残基であるか、又は欠失しており；

F 2 は、F 1 がN末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン若しくはグルタミン酸残基である場合には、アルギニンまたはグルタミン酸残基を表し、F 1 が欠失している場合には、N末端で誘導体化されていてもよいアルギニン又はグルタミン酸残基を表し；

F 3 は、芳香族アミノ酸残基を表し；

25 F 4、F 5 及び F 9 は、独立して、アルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン又はグルタミン酸残基を表し；

F 6 は、グルタミン酸残基を表し；

F 7 は、プロリン、グリシン、オルニチン、リジン、アラニン、シトルリン又はアルギニン残基を表し；

F 8 は、チロシン、フェニルアラニン、アラニン、ナフチルアラニン、シ

トルリン又はグルタミン酸残基を表し；

F 1 0 は、シトルリン、グルタミン酸、アルギニン又はリジン残基を表し；

5 F 1 1 は、C末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、グルタミン酸、リジン又はシトルリン残基を表し；

上記式中、C y s はシステイン残基を表し、T y r はチロシン残基を表し、4 位と 1 3 位のシステイン残基はジスルフィド結合により連結していてもよく、アミノ酸はL体であってもD体であってもよい) で示されるペプチド又はその塩、

10 (1 0) 下記式 (I g)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

G1-G2-G3-Cys-Tyr-G4-G5-G6-G7-G8-G9-G10-Cys-G11 (I g)

(式中、

15 G 1 は、N末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン若しくはグルタミン酸残基であるか、又は欠失しており；

G 2 は、G 1 がN末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン若しくはグルタミン酸残基である場合には、アルギニンまたはグルタミン酸残基を表し、G 1 が欠失している場合には、N末端で誘導体化されていてもよいアルギニン又はグルタミン酸残基を表し；

G 3 は、芳香族アミノ酸残基を表し；

G 4、G 5 及び G 9 は、独立して、アルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン又はグルタミン酸残基を表し；

25 G 6 は、プロリン、グリシン、オルニチン、リジン、アラニン、シトルリン、アルギニン又はグルタミン酸残基を表し；

G 7 は、プロリン、グリシン、オルニチン、リジン、アラニン、シトルリン又はアルギニン残基を表し；

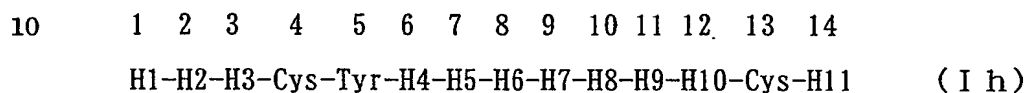
G 8 は、グルタミン酸残基を表し；

G 1 0 は、シトルリン、グルタミン酸、アルギニン又はリジン残基を表し；

G 1 1 は、C末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、グルタミン酸、リジン又はシトルリン残基を表し；

- 5 上記式中、C y s はシステイン残基を表し、T y r はチロシン残基を表し、4位と13位のシステイン残基はジスルフィド結合により連結していてもよく、アミノ酸はL体であってもD体であってもよい) で示されるペプチド又はその塩、

(11) 下記式 (I h)



(式中、

- H 1 は、N末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン若しくはグルタミン酸残基であるか、又は欠失
15 しており；

- H 2 は、H 1 がN末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン若しくはグルタミン酸残基である場合には、アルギニンまたはグルタミン酸残基を表し、H 1 が欠失している場合には、N末端で誘導体化されていてもよいアルギニン又はグルタミン酸残基を
20 表し；

H 3 は、芳香族アミノ酸残基を表し；

H 4 及びH 5 は、独立して、アルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン又はグルタミン酸残基を表し；

- H 6 は、プロリン、グリシン、オルニチン、リジン、アラニン、シトルリン、アルギニン又はグルタミン酸残基を表し；
25

H 7 は、プロリン、グリシン、オルニチン、リジン、アラニン、シトルリン又はアルギニン残基を表し；

H 8 は、チロシン、フェニルアラニン、アラニン、ナフチルアラニン、シトルリン又はグルタミン酸残基を表し；

H 9 は、グルタミン酸残基を表し；

H 1 0 は、シトルリン、グルタミン酸、アルギニン又はリジン残基を表し；

H 1 1 は、C末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、グルタミン酸、
5 リジン又はシトルリン残基を表し；

上記式中、C y s はシステイン残基を表し、T y r はチロシン残基を表し、
4位と13位のシステイン残基はジスルフィド結合により連結していてもよく、
アミノ酸はL体であってもD体であってもよい)で示されるペプチド又はその塩、

10 (12) 下記式 (I i)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

I1-I2-I3-Cys-Tyr-I4-I5-I6-I7-I8-I9-I10-Cys-I11 (I i)

(式中、

I 1 は、N末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、リジン、オルニチン、
15 シトルリン、アラニン若しくはグルタミン酸残基であるか、又は欠失しており；

I 2 は、I 1 がN末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、リジン、オルニチン、
シトルリン、アラニン若しくはグルタミン酸残基である場合には、アルギニンまたはグルタミン酸残基を表し、I 1 が欠失している場合には、
20 N末端で誘導体化されていてもよいアルギニン又はグルタミン酸残基を表し；

I 3 は、芳香族アミノ酸残基を表し；

I 4、I 5及びI 9は、独立して、アルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、
アラニン又はグルタミン酸残基を表し；

25 I 6 は、プロリン、グリシン、オルニチン、リジン、アラニン、シトルリン、アルギニン又はグルタミン酸残基を表し；

I 7 は、プロリン、グリシン、オルニチン、リジン、アラニン、シトルリン又はアルギニン残基を表し；

I 8 は、チロシン、フェニルアラニン、アラニン、ナフチルアラニン、シ

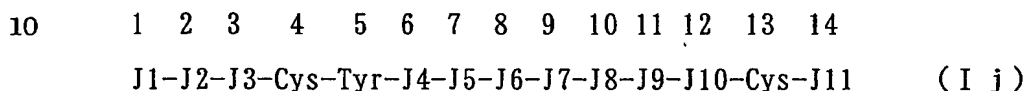
トルリン又はグルタミン酸残基を表し；

I 1 0 は、グルタミン酸、アルギニン又はリジン残基を表し；

I 1 1 は、C末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、グルタミン酸、リジン又はシトルリン残基を表し；

- 5 上記式中、C y s はシステイン残基を表し、T y r はチロシン残基を表し、4位と13位のシステイン残基はジスルフィド結合により連結していてもよく、アミノ酸はL体であってもD体であってもよい) で示されるペプチド又はその塩、

(13) 下記式 (I j)



(式中、

- J 1 は、N末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン若しくはグルタミン酸残基であるか、又は欠失
15 しており；

- J 2 は、J 1 がN末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン若しくはグルタミン酸残基である場合には、アルギニンまたはグルタミン酸残基を表し、J 1 が欠失している場合には、N末端で誘導体化されていてもよいアルギニン又はグルタミン酸残基を
20 表し；

J 3 は、芳香族アミノ酸残基を表し；

J 4、J 5 及び J 9 は、独立して、アルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン又はグルタミン酸残基を表し；

- J 6 は、プロリン、グリシン、オルニチン、リジン、アラニン、シトルリン、アルギニン又はグルタミン酸残基を表し；
25

J 7 は、プロリン、グリシン、オルニチン、リジン、アラニン、シトルリン又はアルギニン残基を表し；

J 8 は、チロシン、フェニルアラニン、アラニン、ナフチルアラニン、シトルリン又はグルタミン酸残基を表し；

J 1 0 は、シトルリン、グルタミン酸、アルギニン又はリジン残基を表し；

J 1 1 は、C末端で誘導体化されていてもよいグルタミン酸、リジン又はシトルリン残基を表し；

- 5 上記式中、C y s はシステイン残基を表し、T y r はチロシン残基を表し、4位と13位のシステイン残基はジスルフィド結合により連結していてもよく、アミノ酸はL体であってもD体であってもよい）で示されるペプチド又はその塩、

（14）以下の(1)～(58)のいずれかのペプチドまたはその塩：

- 10 (1) Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH；
 (2) Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH；
 (3) Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH；
 (4) Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Cit-Cit-Cys-Arg-OH；
 (5) Ac-Cit-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH；
15 (6) Ac-Cit-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH；
 (7) Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DCit-Pro-Tyr-Cit-Cit-Cys-Arg-OH；
 (8) Ac-Cit-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DLys-Pro-Tyr-Cit-Cit-Cys-Arg-OH；
 (9) Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂；
20 (10) Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Cit-Cit-Cys-Arg-NH₂；
 (11) Ac-Cit-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂；
 (12) Ac-Cit-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂；
25 (13) Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DCit-Pro-Tyr-Cit-Cit-Cys-Arg-NH₂；
 (14) Ac-Cit-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DLys-Pro-Tyr-Cit-Cit-Cys-Arg-NH₂；

- (15) H-DGlu-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH ;
- (16) H-Arg-Glu-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH ;
- (17) H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Glu-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH ;
- 5 (18) H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Glu-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH ;
- (19) H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH ;
- (20) H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DLys-Pro-Tyr-Glu-Cit-Cys-Arg-OH ;
- (21) H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Glu-OH ;
- (22) H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-
- 10 NH₂ ;
- (23) H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-DGlu-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;
- (24) H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-DGlu-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;
- 15 (25) H-DGlu-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;
- (26) H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-DGlu-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;
- (27) H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-DGlu-Cys-Arg-
- 20 NH₂ ;
- (28) Ac-DGlu-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;
- (29) Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-DGlu-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;
- 25 (30) Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-DGlu-Cys-Arg-NH₂ ;
- (31) Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;
- (32) guanyl-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-

- Arg-NH₂ ;
- (33) TMguanyl-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;
- (34) TMguanyl-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;
- 5 (35) 4F-benzoyl-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;
- (36) 2F-benzoyl-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;
- 10 (37) APA-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;
- (38) desamino-R-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;
- (39) guanyl-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;
- 15 (40) succinyl-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;
- (41) glutaryl-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;
- (42) deaminoTMG-APA-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;
- 20 (43) nelfinabiryl-succinyl-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;
- (44) AZT-glutaryl-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;
- 25 (45) R-CH₂-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;
- (46) H-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;
- (47) TMguanyl-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;
- (48) ACA-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-

NH₂ ;

(49) ACA-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH ;

(50) H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Arg-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;

(51) Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Arg-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;

(52) Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;

(53) Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;

(54) 4F-benzoyl-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂

(55) 4F-benzoyl-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NHMe

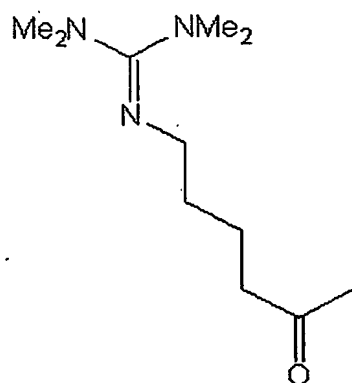
(56) 4F-benzoyl-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NHEt

(57) 4F-benzoyl-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NHiPr

(58) 4F-benzoyl-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-tyramine

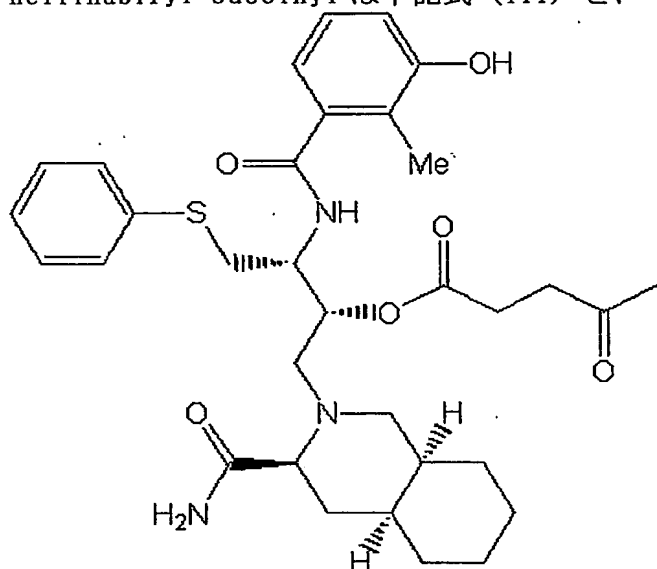
(各配列中、N末端アミノ酸の左の記号はアミノ基が誘導体化されているか、またはされていないことを示し、Hは誘導体化されていないことを、Acはアセチル基を、guanylはグアニル基を、succinylはスクシニル基を、

glutarylはグルタリル基を、TMguanylはテトラメチルグアニル基を、2F-beozoylは2-フルオロベンゾイル基を、4F-benzoylは4-フルオロベンゾイル基を、APAは5-アミノペンタノイル基を、ACAは6-アミノヘキサノイル基を、desamino-Rは2-デスアミノ-アルギニル基を、deaminoTMG-APAは下記式(II)を、



(II)

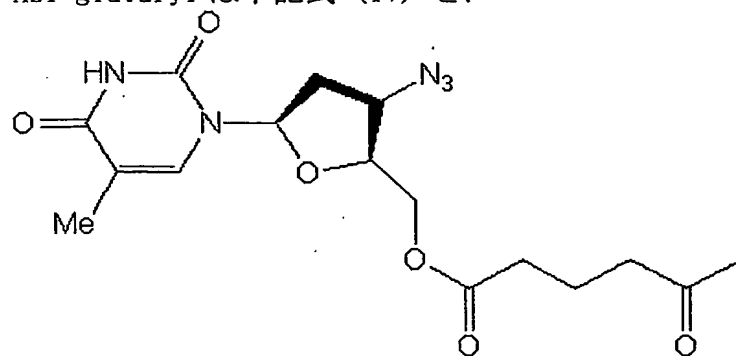
nelfinabiryl-succinyl は下記式 (III) を、



(III)

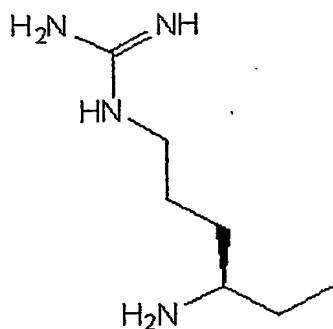
5

AZT-glutaryl は下記式 (IV) を、



(IV)

R-CH₂ は下記式 (V)



(V)

- をそれぞれ示し、Arg は L-アルギニン残基を、Nal は L-3-(2-ナフチル)アラニン残基を、Cys は L-システイン残基を、Tyr は L-チロシン残基を、Cit は L-シトルリン残基を、Lys は L-リジン残基を、DLys は D-リジン残基を、Pro は L-プロリン残基を、DCit は D-シトルリン残基を、DGLu は D-グルタミン酸残基を、Glu は L-グルタミン酸残基をそれぞれ示し、2つのシステイン残基は分子内ジスルフィド結合により連結しており、C末端アミノ酸の右の記号はカルボキシル基が誘導体化されているか、またはされていないことを示し、OH は誘導体化されていないことを、NH₂ はアミノ基で、NMe はメチルアミノ基で、NEt はエチルアミノ基で、NiPr はイソプロピルアミノ基で、tyramine は p-ヒドロキシフェニルエチルアミノ基でアミド化されていることをそれぞれ示す)、

- (15) (3) ~ (14) のいずれかに記載のペプチド又はその塩を含有してなる医薬、
- 15 (16) CXCR4拮抗剤である(15)記載の医薬、
- (17) 癌または慢性関節リウマチの予防及び／又は治療剤である(15)記載の医薬、
- (18) 癌種が乳癌または膵臓癌である(17)記載の医薬、
- (19) 哺乳動物に対して(3)。(14) のいずれかに記載のペプチド又はその塩の有効量を投与することを特徴とする、癌または慢性関節リウマチの予防・治療方法、
- 20 (20) 癌または慢性関節リウマチの予防及び／又は治療剤を製造するための(3) ~ (14) のいずれかに記載のペプチド又はその塩の使用、
- (21) 哺乳動物に対して下記式(Ia)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

A1-A2-A3-Cys-Tyr-A4-A5-A6-A7-A8-A9-A10-Cys-A11 (I a)

(式中、

5 A1は、N末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン若しくはグルタミン酸残基であるか、又は欠失しており；

A2は、A1がN末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン若しくはグルタミン酸残基である場合には、アルギニンまたはグルタミン酸残基を表し、A1が欠失している場合には、N末端で誘導体化されていてもよいアルギニン又はグルタミン酸残基を表し；

A3は、芳香族アミノ酸残基を表し；

A4、A5及びA9は、独立して、アルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン又はグルタミン酸残基を表し；

15 A6は、プロリン、グリシン、オルニチン、リジン、アラニン、シトルリン、アルギニン又はグルタミン酸残基を表し；

A7は、プロリン、グリシン、オルニチン、リジン、アラニン、シトルリン又はアルギニン残基を表し；

20 A8は、チロシン、フェニルアラニン、アラニン、ナフチルアラニン、シトルリン又はグルタミン酸残基を表し；

A10は、シトルリン、グルタミン酸、アルギニン又はリジン残基を表し；

A11は、C末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、グルタミン酸、リジン又はシトルリン残基を表し；

25 上記式中、Cysはシステイン残基を表し、Tyrはチロシン残基を表し、4位と13位のシステイン残基はジスルフィド結合により連結していてもよく、アミノ酸はL体であってもD体であってもよい)で示されるペプチド又はその塩の有効量を投与することを特徴とする、癌または慢性関節リウマチの予防・治療方法、および

(22) 癌または慢性関節リウマチの予防及び／又は治療剤を製造するための下記式 (I a)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

A1-A2-A3-Cys-Tyr-A4-A5-A6-A7-A8-A9-A10-Cys-A11 (I a)

5 (式中、

A 1 は、N末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン若しくはグルタミン酸残基であるか、又は欠失しており；

10 A 2 は、A 1 がN末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン若しくはグルタミン酸残基である場合には、アルギニンまたはグルタミン酸残基を表し、A 1 が欠失している場合には、N末端で誘導体化されていてもよいアルギニン又はグルタミン酸残基を表し；

A 3 は、芳香族アミノ酸残基を表し；

15 A 4、A 5 及び A 9 は、独立して、アルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン又はグルタミン酸残基を表し；

A 6 は、プロリン、グリシン、オルニチン、リジン、アラニン、シトルリン、アルギニン又はグルタミン酸残基を表し；

20 A 7 は、プロリン、グリシン、オルニチン、リジン、アラニン、シトルリン又はアルギニン残基を表し；

A 8 は、チロシン、フェニルアラニン、アラニン、ナフチルアラニン、シトルリン又はグルタミン酸残基を表し；

A 10 は、シトルリン、グルタミン酸、アルギニン又はリジン残基を表し；

25 A 11 は、C末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、グルタミン酸、リジン又はシトルリン残基を表し；

上記式中、Cys はシステイン残基を表し、Tyr はチロシン残基を表し、4位と13位のシステイン残基はジスルフィド結合により連結していてもよく、アミノ酸はL体であってもD体であってもよい) で示されるペプチド又

はその塩の使用、

等を提供する。

本発明のペプチド性化合物は強力なCXCR4拮抗作用を有し、CXCR4とCXCL12/SDF-1との結合を阻害することにより、癌および慢性関節リウマチに対して治療効果を示す。

図面の簡単な説明

図1は、CXCL12によって誘導される乳癌細胞遊走性に対するTE-14005の阻害活性を示す。縦軸は細胞遊走性(OD550nmの吸光度)を示す。左よりCXCL12無添加時(陰性対照)、CXCL12添加時(陽性対照)、CXCL12およびTE-14005 10nM添加時、CXCL12およびTE-14005 100nM添加時、CXCL12およびTE-14005 1μM添加時、CXCL12およびTE-14005 10μM添加時の結果を示す(平均値+標準偏差、n=2)。*は各TE-14005添加群の、陽性対照群との有意性を示す(Williams検定、 $p \leq 0.025$)。

図2は、CXCL12によって誘導される乳癌細胞遊走性に対するTC-14012の阻害活性を示す。縦軸は細胞遊走性(OD550nmの吸光度)を示す。左よりCXCL12無添加時(陰性対照)、CXCL12添加時(陽性対照)、CXCL12およびTC-14012 1nM添加時、CXCL12およびTC-14012 10nM添加時、CXCL12およびTC-14012 100nM添加時、CXCL12およびTC-14012 1μM添加時の結果を示す(平均値+標準偏差、n=2)。*は各TC-14012添加群の、陽性対照群との有意性を示す(Williams検定、 $p \leq 0.025$)。

図3は、CXCL12によって誘導されるT細胞由来白血病細胞の遊走性に対する4Fbenzoyl-TN-14003の阻害活性を示す。縦軸は細胞遊走性(細胞数)を示す。左よりCXCL12無添加時(陰性対照)、CXCL12添加時(陽性対照)、CXCL12および4Fbenzoyl

—TN—14003 1nM添加時、CXCL12および4Fbenzoyl—TN—14003 10nM添加時、CXCL12および4Fbenzoyl—TN—14003 100nM添加時、CXCL12および4Fbenzoyl—TN—14003 1 μ M添加時の結果を示す（平均値+標準偏差、n=2）。*は各4Fbenzoyl—TN—14003添加群の、陽性対照群との有意性を示す（Williams検定、 $p \leq 0.025$ ）。

図4は、CXCL12によって誘導される乳癌細胞遊走性に対する4Fbenzoyl—TN—14003の阻害活性を示す。縦軸は細胞遊走性（OD550nmの吸光度）を示す。左よりCXCL12無添加時（陰性対照）、CXCL12添加時（陽性対照）、CXCL12および4Fbenzoyl—TN—14003 10nM添加時、CXCL12および4Fbenzoyl—TN—14003 100nM添加時、CXCL12および4Fbenzoyl—TN—14003 1 μ M添加時、CXCL12および4Fbenzoyl—TN—14003 10 μ M添加時の結果を示す（平均値+標準偏差、n=2）。*は各4Fbenzoyl—TN—14003添加群の、陽性対照群との有意性を示す（Williams検定、 $p \leq 0.025$ ）。

図5は、ヒト乳癌細胞を移植されたマウスにおける4Fbenzoyl—TN—14003の肺転移抑制活性を示す肺組織染色像である。図5Aが対照群（生食投与群）の肺、図5Bが4Fbenzoyl—TN—14003投与群の肺の像である。

図6は、SDF-1 α （CXCL12）によって誘導される Jurkat 細胞の遊走性に対する4Fbenzoyl—TN—14003の阻害活性を示す。縦軸は細胞遊走性（input に対する移動細胞の割合）を示す。左よりSDF-1 α 無添加時、SDF-1 α 添加時、SDF-1 α および4Fbenzoyl—TN—14003 10pM添加時、SDF-1 α および4Fbenzoyl—TN—14003 100pM添加時、SDF-1 α および4Fbenzoyl—TN—14003 1nM添加時、SDF-1 α および4Fbenzoyl—TN—14003 10nM添加時、SDF-1 α および4Fbenzoyl—TN—14003 100nM添加時の結果を示す。

図7は、SDF-1 α (CXCL12) によって誘導されるマウス脾細胞の遊走性に対する4Fbenzoyl-TN-14003の阻害活性を示す。縦軸は細胞遊走性 (input に対する移動細胞の割合) を示す。左よりSDF-1 α 無添加時、SDF-1 α 添加時、SDF-1 α および4Fbenzoyl-TN-14003 10 pM 添加時、SDF-1 α および4Fbenzoyl-TN-14003 100 pM 添加時、SDF-1 α および4Fbenzoyl-TN-14003 1 nM 添加時、SDF-1 α および4Fbenzoyl-TN-14003 10 nM 添加時、SDF-1 α および4Fbenzoyl-TN-14003 100 nM 添加時の結果を示す。

図8は、SRBC誘発によるマウスDTH反応に対する4Fbenzoyl-TN-14003の抑制効果を示す。縦軸は腫脹による足蹠の厚みの増加 (平均値 \pm 標準誤差、 $n=7$) を示す。左よりPBS投与 (対照) 群、4Fbenzoyl-TN-14003 4.8 μ g/日投与群、4Fbenzoyl-TN-14003 24 μ g/日投与群、4Fbenzoyl-TN-14003 120 μ g/日投与群の結果を示す。*は $P \leq 0.025$ (PBS投与群との比較; Williams検定) を示す。

図9は、マウスコラーゲン関節炎に対する既存薬の作用を示す。図9Aは体重の変動 [縦軸: 体重 (g) (平均値 \pm 標準誤差、 $n=8$)、横軸: 追加免疫後の日数]、図9Bは発病率の変動 [縦軸: 発病率 (%) ($n=8$)、横軸: 追加免疫後の日数]、図9Cは関節炎スコアの変動 [縦軸: 関節炎スコア (平均値 \pm 標準誤差、 $n=8$)、横軸: 追加免疫後の日数]、図9Dは踵厚の変動 [縦軸: 踵厚 (mm) (平均値 \pm 標準誤差、 $n=8$)、横軸: 追加免疫後の日数] をそれぞれ示す (□: 正常マウス群、■: 薬物非投与 (対照) 群、△: インドメタシン投与群、▲: メトトレキサート投与群、●: FK506投与群)。また、図9Eは追加免疫2週後の後肢腫脹に及ぼす各薬物の効果 [縦軸: 後肢重量 (mg) (平均値 \pm 標準誤差、 $n=8$)]、図9Fは追加免疫2週後の抗ウシII型コラーゲンIgG2a抗体価に及ぼす各薬物の効果 [縦軸: 抗体価 (A450) (平均値 \pm 標準誤差、 $n=8$)] をそれぞれ示す [左より正常マウス群、薬物非投与 (対照) 群、インドメタシン

(IND) 投与群、メトトレキサート (MTX) 投与群、FK 506 投与群] を示す]。##は $P \leq 0.01$ (正常マウス群との比較; t 検定)、*および**はそれぞれ $P \leq 0.05$ および $P \leq 0.01$ (薬物非投与群との比較; Dunnett 検定) を示す。

- 5 図10は、マウスコラーゲン関節炎に対する4Fbenzoyl-TN-14003の作用を示す。図10Aは体重の変動 [縦軸: 体重 (g) (平均値±標準誤差)、横軸: 追加免疫後の日数]、図10Bは発病率の変動 [縦軸: 発病率 (%), 横軸: 追加免疫後の日数]、図10Cは関節炎スコアの変動 [縦軸: 関節炎スコア (平均値±標準誤差)、横軸: 追加免疫後の日数]、図10Dは踵厚の変動 [縦軸: 踵厚 (mm) (平均値±標準誤差)、横軸: 追加免疫後の日数] をそれぞれ示す [□: 正常マウス群 (n=8)、■: 薬物非投与 (対照) 群 (n=12)、△: 4Fbenzoyl-TN-14003 投与群 (n=11)]。また、図10Eは追加免疫2週後の後肢腫脹に及ぼす4Fbenzoyl-TN-14003の効果 [縦軸: 後肢重量 (mg) (平均値±標準誤差)]、図10Fは追加免疫2週後の抗ウシII型コラーゲン IgG2a 抗体価に及ぼす4Fbenzoyl-TN-14003の効果 [縦軸: 抗体価 (A450) (平均値±標準誤差)] をそれぞれ示す [左より正常マウス群 (n=8)、薬物非投与 (対照) 群 (n=12)、4Fbenzoyl-TN-14003 投与群 (n=11) を示す]。##は $P \leq 0.01$ (正常マウス群との比較; t 検定)、**は $P \leq 0.01$ (薬物非投与群との比較; t 検定) を示す。
- 10
- 15
- 20

発明を実施するための最良の形態

- 本明細書に記載されるペプチドは、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端 (アミノ末端)、右端がC末端 (カルボキシル末端) である。
- 25

本明細書および図面において、アミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commision on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体が存在する場合は、特に明示しなければL体を

示すものとする。

	G l yまたはG	: グリシン
	A l aまたはA	: アラニン
	V a lまたはV	: バリン
5	L e uまたはL	: ロイシン
	I l eまたはI	: イソロイシン
	S e rまたはS	: セリン
	T h rまたはT	: スレオニン
	C y sまたはC	: システイン
10	M e tまたはM	: メチオニン
	G l uまたはE	: グルタミン酸
	A s pまたはD	: アスパラギン酸
	L y sまたはK	: リジン
	A r gまたはR	: アルギニン
15	H i sまたはH	: ヒスチジン
	P h eまたはF	: フェニルアラニン
	T y rまたはY	: チロシン
	T r pまたはW	: トリプトファン
	P r oまたはP	: プロリン
20	A s nまたはN	: アスパラギン
	G l nまたはQ	: グルタミン
	p G l u	: ピログルタミン酸
	N a l	: 3-(2-ナフチル) アラニン
	C i t	: シトルリン
25	D L y s	: D-リジン
	D C i t	: D-シトルリン
	D G l u	: D-グルタミン酸
	M e	: メチル基
	E t	: エチル基

Bu : ブチル基

Ph : フェニル基

また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

- 5 BHA : ベンズヒドリルアミン
pMBHA : p-メチルベンズヒドリルアミン
Tos : p-トルエンスルフォニル
CHO : ホルミル
HONB : N-ヒドロキシー-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキシイミ
10 ド
OcHex : シクロヘキシルエステル
Bzl : ベンジル
Cl₂-Bzl : ジクロロベンジル
Bom : ベンジルオキシメチル
15 Z : ベンジルオキシカルボニル
Br-Z : 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
Boc : t-ブチルオキシカルボニル
DCM : ジクロロメタン
HOBt : 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
20 DCC : N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド
TFA : トリフルオロ酢酸
DIEA : ジイソプロピルエチルアミン
Fmoc : N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
DNP : ジニトロフェニル
25 Bum : ターシャリープトキシメチル
Trt : トリチル
Ac : アセチル
guanyl : グアニル
succinyl : スクシニル

glutaryl: グルタリル

TMguanyl: テトラメチルグアニル

2F-benzoyl: 2-フルオロベンゾイル

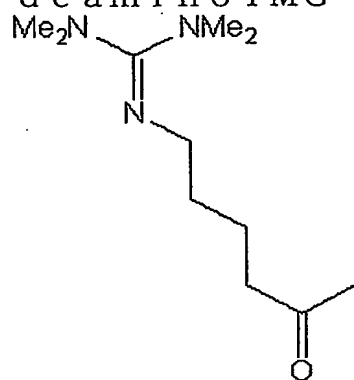
4F-benzoyl: 4-フルオロベンゾイル

5 APA: 5-アミノペンタノイル

ACA: 6-アミノヘキサノイル

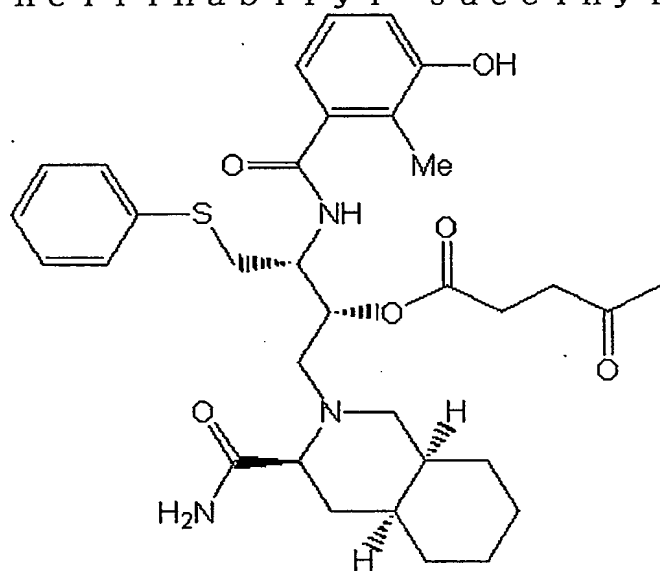
desamino-R: 2-デスアミノ-アルギニル

deaminoTMG-APA: 下記式 (II)



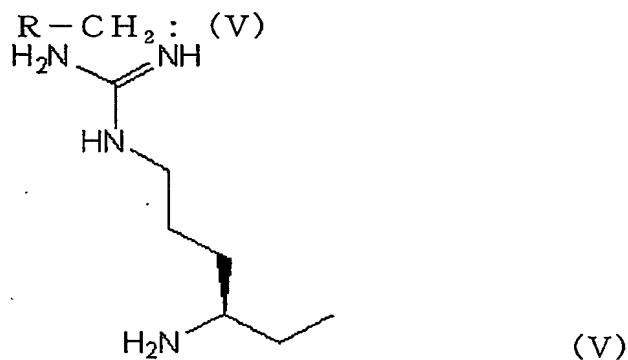
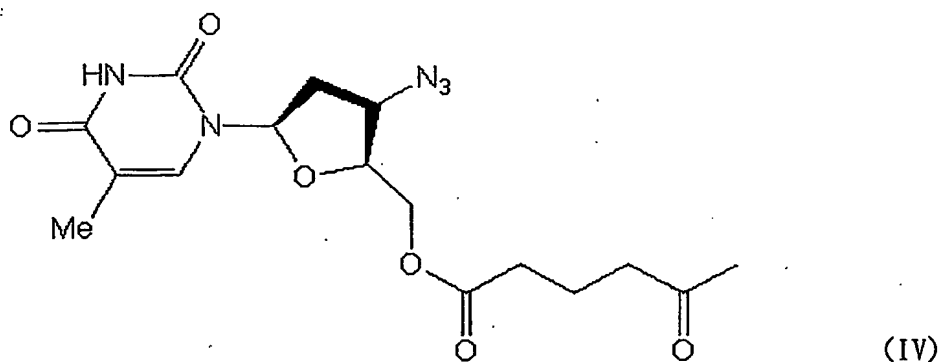
(II)

10 nelfinabiryl-succinyl: 下記式 (III)



(III)

AZT-glutaryl: 下記式 (IV)



尚、ペプチドのN末端アミノ酸において「H-」とは末端アミノ基が誘導
 5 体化されていないことを示し、C末端アミノ酸において「-OH」とは末端
 カルボキシル基が誘導体化されていないことを示す。

本発明は、CXCR4拮抗作用を有する化合物を含有する癌ならびに慢性
 関節リウマチの予防及び／又は治療剤を提供する。「CXCR4拮抗作用
 を有する化合物」は、CXCR4とその生理的リガンドであるCXCL12
 10 /SDF-1 α との結合を拮抗的に阻害して抗癌作用（例えば、遊走阻害作
 用、浸潤阻害作用および抗転移作用など）または抗慢性関節リウマチ作用
 （例えば、遊走阻害作用）を発揮するものであり、より具体的には、下記式
 (I a)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
 15 A1-A2-A3-Cys-Tyr-A4-A5-A6-A7-A8-A9-A10-Cys-A11 (I a)

(式中、

A1は、N末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、リジン、オルニ
 チン、シトルリン、アラニン若しくはグルタミン酸残基であるか、又は欠失
 しており；

A 2 は、A 1 がN末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン若しくはグルタミン酸残基である場合には、アルギニンまたはグルタミン酸残基を表し、A 1 が欠失している場合には、N末端で誘導体化されていてもよいアルギニン又はグルタミン酸残基を表し；

A 3 は、芳香族アミノ酸残基を表し；

A 4、A 5 及びA 9 は、独立して、アルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン又はグルタミン酸残基を表し；

A 6 は、プロリン、グリシン、オルニチン、リジン、アラニン、シトルリン、アルギニン又はグルタミン酸残基を表し；

A 7 は、プロリン、グリシン、オルニチン、リジン、アラニン、シトルリン又はアルギニン残基を表し；

A 8 は、チロシン、フェニルアラニン、アラニン、ナフチルアラニン、シトルリン又はグルタミン酸残基を表し；

A 10 は、シトルリン、グルタミン酸、アルギニン又はリジン残基を表し；

A 11 は、C末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、グルタミン酸、リジン又はシトルリン残基を表し；

上記式中、C y s はシステイン残基を表し、T y r はチロシン残基を表し、4 位と1 3 位のシステイン残基はジスルフィド結合により連結していてもよく、アミノ酸はL 体であってもD 体であってもよい)

で示されるペプチド、そのアミド、そのエステルまたはその塩（以下、「本発明のペプチド」と総称する場合もある）が挙げられる。

上記式（I a）で示されるA 1 は、N末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン若しくはグルタミン酸残基（L 体であってもD 体であってもよい）を表すか、又は欠失しており、好ましくは、N末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、シトルリン、アラニン若しくはD-グルタミン酸残基を表すか、又は欠失している。「N末端で誘導体化され」たものとしては、例えば、ホルミル基；アシル基、例

例えば、アセチル基、プロピオニル基、ブチリル基、ペンタノイル基、ヘキサノイル基等のC₂₋₆アルカノイル基、ベンゾイル基、置換ベンゾイル基
(例：2-フルオロベンゾイル、3-フルオロベンゾイル基、4-フルオロベンゾイル基、2-ブロモベンゾイル基、3-ブロモベンゾイル基、4-ブロモベンゾイル基、2-ニトロベンゾイル基、3-ニトロベンゾイル基、4-ニトロベンゾイル基) 等のアリールカルボニル基、サクシニル基、グルタリル基；ニコチニル基；イソニコチニル基；アルキルスルフォニル基（例：メタンスルフォニル基、エタンスルフォニル基、プロパンスルフォニル基、カンファースルフォニル基）；アリールスルホニル基（例：p-トルエンスルフォニル基、4-フルオロベンゼンスルフォニル基、メシチレンスルフォニル基、4-アミノベンゼンスルフォニル基、ダンシル基、4-ブロモベンゼンスルフォニル基）などで保護されているもの等が挙げられるが、これらに限定されない。あるいはN末端のアミノ基を欠失していてもよい。

上記式 (I a) で示されるA 2は、A 1がN末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン若しくはグルタミン酸残基（L体であってもD体であってもよい）である場合には、アルギニンまたはグルタミン酸残基（L体であってもD体であってもよい）を表し、A 1が欠失している場合には、N末端で誘導体化されていてもよいアルギニン又はグルタミン酸残基（L体であってもD体であってもよい）を表し、好ましくは、A 1がN末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、シトルリン、アラニン若しくはグルタミン酸残基である場合には、アルギニンまたはグルタミン酸残基を表し、A 1が欠失している場合には、N末端で誘導体化されていてもよいアルギニン又はグルタミン酸残基を表す。「N末端で誘導体化され」たものとしては、上記A 1と同様のものが挙げられるが、それらに限定されない。

上記式 (I a) で示されるA 3は、芳香族アミノ酸残基（例えば、フェニルアラニン、トリプトファン、3-（2-ナフチル）アラニン、チロシン、4-フルオロフェニルアラニン、3-（1-ナフチル）アラニン）（L体であってもD体であってもよい）を表し、好ましくは、フェニルアラニン、ト

リプトファン、3-(2-ナフチル)アラニンを表す。

上記式(I a)で示されるA 4は、アルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン又はグルタミン酸残基(L体であってもD体であってもよい)を表し、好ましくは、アルギニン、シトルリン、アラニン又はL-もしくはD-グルタミン酸残基を表す。

上記式(I a)で示されるA 5は、アルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン又はグルタミン酸残基を表し、好ましくは、アルギニン、シトルリン、アラニン、リジン又はグルタミン酸残基を表す。

上記式(I a)で示されるA 6は、プロリン、グリシン、オルニチン、リジン、アラニン、シトルリン、アルギニン又はグルタミン酸残基(L体であってもD体であってもよい)を表し、好ましくは、D-リジン、D-アラニン、D-シトルリン又はD-グルタミン酸残基を表す。

上記式(I a)で示されるA 7は、プロリン又はアラニン残基(L体であってもD体であってもよい)を表し、好ましくは、プロリン又はアラニン残基を表す。

上記式(I a)で示されるA 8は、チロシン、フェニルアラニン、アラニン、ナフチルアラニン、シトルリン又はグルタミン酸残基(L体であってもD体であってもよい)を表し、好ましくは、チロシン、アラニン又はD-グルタミン酸残基を表す。

上記式(I a)で示されるA 9は、アルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン又はグルタミン酸残基(L体であってもD体であってもよい)を表し、好ましくは、アルギニン、シトルリン又はグルタミン酸残基を表す。

上記式(I a)で示されるA 10は、シトルリン、グルタミン酸、アルギニン又はリジン残基(L体であってもD体であってもよい)を表し、好ましくは、シトルリン又はD-グルタミン酸残基を表す。

上記式(I a)で示されるA 11は、C末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、グルタミン酸、リジン又はシトルリン残基(L体であってもD体であってもよい)を表し、好ましくは、C末端で誘導体化されていてもよ

いアルギニン又はグルタミン酸残基を表す。「C末端の誘導体化」としては、例えば、アミド化 ($-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHR}$ 、 $-\text{NRR}'$)、エステル化 ($-\text{COOR}$) 等が挙げられる。ここでアミド、エステルにおけるR及びR'としては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくはn-ブチルなどのC₁₋₆アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC₃₋₈シクロアルキル基、例えば、フェニル、 α -ナフチルなどのC₆₋₁₂アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル-C₁₋₂アルキル基もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル-C₁₋₂アルキル基などのC₇₋₁₄アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

本発明のペプチドがC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のペプチドに含まれる。この場合のアミドおよびエステルとしては、例えば上記A11について例示されたC末端のアミドおよびエステルなどが同様に用いられる。さらに、本発明のペプチドには、上記したペプチドにおいて、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₂₋₆アルカノイル基などのC₁₋₆アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合しているいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

本発明のペプチドの塩としては、酸または塩基との生理学的に許容される塩が挙げられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが挙げられる。

また、本発明のペプチドは、上記式(Ia)で示されるA1～A11のいずれか1つが以下の場合には、新規ペプチドである：

(i) A1がグルタミン酸残基又は欠失している場合（即ち、上記式(I

b) の場合) ;

(ii) A 2、A 4、A 6、A 8 及び A 9 のいずれか 1 つがグルタミン酸残基の場合 (即ち、上記式 (I c) ~ (I g) のいずれかの場合) ;

(iii) A 5 がアルギニン又はグルタミン酸残基の場合即ち、上記式 (I

5 h) の場合) ;

(iv) A 1 0 がグルタミン酸、アルギニン又はリジン残基の場合即ち、上記式 (I i) の場合) ;

(v) A 1 1 がグルタミン酸、リジン又はシトルリン残基の場合即ち、上記式 (I j) の場合) 。

10 尚、上記アミノ酸残基は、L 体でも D 体でもよい。

本発明の新規ペプチドとして、好ましくは以下の (1) ~ (58) のアミノ酸配列 (各配列中、2 つのシステイン残基はジスルフィド結合により連結している) を有するペプチドが例示される。

(1) Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH
15 (AcTC14003)

(2) Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH
(AcTC14005)

(3) Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH
(AcTC14011)

20 (4) Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Cit-Cit-Cys-Arg-OH
(AcTC14013)

(5) Ac-Cit-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH
(AcTC14015)

25 (6) Ac-Cit-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH
(AcTC14017)

(7) Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DCit-Pro-Tyr-Cit-Cit-Cys-Arg-OH
(AcTC14019)

(8) Ac-Cit-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DLys-Pro-Tyr-Cit-Cit-Cys-Arg-OH
(AcTC14021)

- (9) Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂
(AcTC14012)
- (10) Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Cit-Cit-Cys-Arg-NH₂
(AcTC14014)
- 5 (11) Ac-Cit-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂
(AcTC14016)
- (12) Ac-Cit-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂
(AcTC14018)
- (13) Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DCit-Pro-Tyr-Cit-Cit-Cys-Arg-NH₂
10 (AcTC14020)
- (14) Ac-Cit-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DLys-Pro-Tyr-Cit-Cit-Cys-Arg-NH₂
(AcTC14022)
- (15) H-DGlu-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH
(TE14001)
- 15 (16) H-Arg-Glu-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH
(TE14002)
- (17) H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Glu-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH
(TE14003)
- (18) H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Glu-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH
20 (TE14004)
- (19) H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH
(TE14005)
- (20) H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DLys-Pro-Tyr-Glu-Cit-Cys-Arg-OH
(TE14006)
- 25 (21) H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Glu-OH
(TE14007)
- (22) H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂
(TE14011)
- (23) H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-DGlu-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂

- (TE14012)
- (24) H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-DGlu-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂
(TE14013)
- (25) H-DGlu-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂
5 (TE14014)
- (26) H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-DGlu-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂
(TE14015)
- (27) H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-DGlu-Cys-Arg-NH₂
(TE14016)
- 10 (28) Ac-DGlu-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (AcTE14014)
- (29) Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-DGlu-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (AcTE14015)
- (30) Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-DGlu-Cys-Arg-NH₂ (AcTE14016)
- 15 (31) Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (TF1: AcTE14011)
- (32) guanyl-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (TF2: guanyl-TE14011)
- 20 (33) TMguanyl-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (TF3: TMguanyl-TE14011)
- (34) TMguanyl-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (TF4: TMguanyl-TE14011 (2-14))
- (35) 4F-benzoyl-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (TF5: 4F-benzoyl-TE14011)
- 25 (36) 2F-benzoyl-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (TF6: 2F-benzoyl-TE14011)
- (37) APA-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (TF7: APA-TE14011 (2-14))

- (38) desamino-R-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (TF8: desamino-R-TE14011 (2-14))
- (39) guanylyl-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (TF9: guanylyl-TE14011 (2-14))
- 5 (40) succinyl-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (TF10: succinyl-TE14011 (2-14))
- (41) glutaryl-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (TF11: glutaryl-TE14011 (2-14))
- (42) deaminoTMG-APA-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (TF12: deaminoTMG-APA-TE14011 (2-14))
- 10 (43) nelfinabiryl-succinyl-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (TF13: nelfinabiryl-succinyl-TE14011 (2-14))
- (44) AZT-glutaryl-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (TF14: AZT-glutaryl-TE14011 (2-14))
- 15 (45) R-CH₂-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (TF15: R-CH₂NH-RTE14011 (2-14))
- (46) H-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (TF17: TE14011 (2-14))
- (47) TMguanylyl-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (TF18: TMguanylyl-TC14012)
- 20 (48) ACA-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (TF19: ACA-TC14012)
- (49) ACA-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH (TF20: ACA-T140)
- 25 (50) H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Arg-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (TZ14011)
- (51) Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Arg-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (AcTZ14011)
- (52) Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂

(AcTN14003)

(53) Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂

(AcTN14005)

(54) 4F-benzoyl-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-
5 Cys-Arg-NH₂ (4F-benzoyl-TN14003)

(55) 4F-benzoyl-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-
Cys-Arg-NHMe (4F-benzoyl-TN14011-Me)

(56) 4F-benzoyl-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-
Cys-Arg-NHEt (4F-benzoyl-TN14011-Et)

10 (57) 4F-benzoyl-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-
Cys-Arg-NHiPr (4F-benzoyl-TN14011-iPr)

(58) 4F-benzoyl-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-
Cys-Arg-tyramine (4F-benzoyl-TN14011-tyramine)

本発明のペプチドは、上記したいずれかのペプチドのアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはそのアミド、そのエステルもしくはその塩をも包含する。ここで「実質的に同一のアミノ酸配列」とは、ペプチドの活性（例えば、リガンドと受容体の結合阻害活性など）またはペプチドの抗癌作用（例えば、遊走阻害作用、浸潤阻害作用および抗転移作用など）または抗リユーマチ作用（例えば、遊走阻害作用）などが、性質的に同質である〔従って、量的にある程度（例えば、約0.01～100倍、好ましくは約0.5～20倍、より好ましくは約0.5～2倍）の差異があってもよい〕ようなアミノ酸配列を意味する。したがって、上記特性を保持する限り、上記式（I a）～（I j）および(1)～(58)のいずれかに示されるアミノ酸配列において1または2以上のアミノ酸に変異を有していてもよい。

25 即ち、本発明においては、元の（無変異の）ペプチドの生理的な特性や化学的な特性に重大な（著しい）変化（＝性質的に異質、もしくは同質であっても量的に著しく異なるような変化）をもたらさないような置換、欠失あるいは挿入（付加）等のアミノ酸配列における変異の結果得られるペプチド

(変異型ペプチド)は、そのような変異を有していない元の(無変異の)ペプチドと実質的に同一であると見なされ、またその変異型ペプチドのアミノ酸配列は、元の(無変異の)ペプチドのアミノ酸配列と実質的に同一であると見なされる。

- 5 一般に、ペプチド配列中におけるアミノ酸の置換、欠失あるいは挿入(付加)などの変異は、そのペプチドの生理的な特性や化学的な特性に大きな(著しい)変化をもたらさないことがしばしばあることは、よく知られた事実である。該置換の例としては、あるアミノ酸が性質(特性)の似ている他のアミノ酸で置換されたものが挙げられ、一般的には、特性の類似性が強い
- 10 アミノ酸相互間で置換が行われる場合ほど、その置換が置換前の元のペプチドにおよぼす特性の変化は小さいと考えられている。アミノ酸は、その特性の類似性を一つの基準にして例えば次のようなクラス：(i) 非極性(疎水性)アミノ酸(例：アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニンなど)；(ii) 極性(中
- 15 性)アミノ酸(例：グリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミンなど)；(iii) 陽電荷をもつ(塩基性)アミノ酸(例：アルギニン、リジン、ヒスチジンなど)；(iv) 負電荷をもつ(酸性)アミノ酸(例：アスパラギン酸、グルタミン酸など)に分類されるので、各クラス内でのアミノ酸置換は、ペプチドの特性に対して保存的(即ち、
- 20 「実質的に同一な」アミノ酸配列を生ずる置換)であり得る。
- 言い換えれば、「実質的に同一のアミノ酸配列」には、
- (i) 上記式(I a)～(I j)および(1)～(58)のいずれかに示されるアミノ酸配列中の1個以上、好ましくは1個以上10個以下、より好ましくは1個以上5個以下のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、
- 25 (ii) 上記式(I a)～(I j)および(1)～(58)のいずれかに示されるアミノ酸配列中の1個以上7個以下、好ましくは1個以上5個以下、より好ましくは1個以上3個以下のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、
- (iii) 上記式(I a)～(I j)および(1)～(58)のいずれかに示されるアミノ酸配列に1個以上15個以下、好ましくは1個以上10個以下、より好

ましくは1個以上5個以下のアミノ酸が付加した（挿入された）アミノ酸配列、あるいは

- (iv) 上記 (i) , (ii) または (iii) のアミノ酸配列を有するペプチド中の構成アミノ酸（特にその側鎖）に修飾を含むペプチド、またはそのアミド、
5 そのエステルもしくはその塩が包含され得る。

- 本発明のペプチドは、そのアミノ酸配列中に上記 (i) ないし (iv) の置換、欠失、挿入（付加）、修飾などを意図的または偶発的に施すことにより、熱やプロテアーゼに対する安定型ペプチドや、該ペプチドの有する阻害活性が高まった高活性型ペプチドに変換させることが可能である。本発明のペプチドは、これら変異型ペプチドまたはそのアミド、そのエステルもしくはその塩をも包含する。
10

- さらに、本発明のペプチドとしては、上記式 (I a) ~ (I j) および (1) ~ (58) のいずれかに示されるアミノ酸配列からなるペプチドの他に、該アミノ酸配列と約 50 ~ 99.9 %（好ましくは 70 ~ 99.9 %、より好ましくは 80 ~ 99.9 %、さらに好ましくは 90 ~ 99.9 %）の相同性を有するアミノ酸配列を含有し、上記式 (I a) ~ (I j) および (1) ~ (58) のいずれかに示されるアミノ酸配列からなるペプチドと実質的に同質の活性を有するペプチドまたはそのアミド、そのエステルもしくはその塩などが挙げられる。該活性としては、例えばリガンドとレセプターとの結合阻害活性、シグナル伝達阻害活性など、該ペプチドが有する阻害活性が挙げられる。阻害活性が「実質的に同質」とは、該レセプターに対する該リガンド結合阻害活性などの特性が同質であることを示す。従って、該レセプターに対する該リガンド結合阻害活性には著しくない程度の強弱が認められてもよく、また、分子量における相違は問題ではない。
20

- 上記式 (1) ~ (58) のいずれかに示されるアミノ酸配列を有するペプチドのアミド、エステルもしくは塩としては、上記一般式 (I a) で示されるペプチドについて例示した通りのものが同様に挙げられる。好ましくは、上記式 (1) ~ (58) のいずれかに示されるアミノ酸配列を有するペプチドは、C末端アミノ酸残基のカルボキシル基がアミド化されていることが望ましい。
25

上記式(1)～(58)に示されるアミノ酸配列を含有するペプチドをはじめとする本発明のペプチドは、自体公知のペプチドの合成法に従って製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①～⑤に記載された方法が挙げられる。

- ① M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966 年)
- ② Schroeder および Luebke、ザ ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965 年)
- ③ 泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975 年)
- ④ 矢島治明 および 榊原俊平、生化学実験講座 1、蛋白質の化学 IV、205、(1977 年)
- ⑤ 矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

具体的なペプチド合成法として、例えば、以下の方法が挙げられる。

通常市販のポリペプチド合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM 樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-Fmoc アミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げるることができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするポリペプチドの配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からポリペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のポリペプチドまたはそれら

のアミド体を取得する。上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、ポリペプチド合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt, HOOBt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物または HOBt エステルあるいは HOOBt エステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、ポリペプチド縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はポリペプチド結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約 -20℃ ~ 50℃ の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常 1.5 ~ 4 倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することができる。

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、ターシャリーペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmoc などが用いられる。カルボキシル

- 基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ターシャリーブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、ターシャリーブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、t-ブチル基などである。チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl₂-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、ターシャリーブチルなどが用いられる。ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。
- 原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt）とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチ

ルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約 -20°C ～ 40°C の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。ポリペプチドのアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α -アミノ基の保護基のみを除いたポリペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したポリペプチドとを製造し、この両ポリペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護ポリペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗ポリペプチドを得ることができる。この粗ポリペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のポリペプチドのアミド体を得ることができる。ポリペプチドのエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、ポリペプチドのアミド体と同様にして、所望のポリペプチドのエステル体を得ることができる。

反応後は通常の精製法、たとえば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明のペプ

チドを精製単離することができる。上記方法で得られるペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

好ましくは、上記式(1)～(58)に示されるアミノ酸配列を有する本発明の新規ペプチドは、後記実施例に記載される方法、あるいはそれらに準じた方法により製造することができる。また、本発明のペプチドは、国際公開第02/20561号パンフレットに記載の方法、あるいはこれらに準じた方法によって製造することができる。

本発明のペプチドを医薬または動物薬として使用する場合は、常套手段に従って実施すればよい。例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、本発明のペプチドを生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などととともに一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのようない甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施にしたがって処方することができる。

注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナト

リウムなど)などが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール(例えば、エタノール)、ポリアルコール(例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール)、非イオン性界面活性剤(例えばポリソルベート80TM、HCO-50)などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤(例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液)、無痛化剤(例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど)、安定剤(例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど)、保存剤(例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど)、酸化防止剤などと配合してもよい。調整された注射液は通常、適当なアンプルに無菌的に充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えばヒトや哺乳動物(例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、マントヒヒ、チンパンジーなど)に対して投与することができる。

本発明のペプチドの投与量は、症状などにより差異はあるが、経口投与する場合、体重60kgに対して一回につき通常約0.1から1000mg、好ましくは約1.0から500mg、より好ましくは約1.0から200mgである。非経口的に投与する場合は、体重60kgに対してその一回の投与量は投与対象、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば注射剤の形では一回につき通常約0.01から300mg程度、好ましくは約0.1から200mg程度、より好ましくは約0.1から100mg程度を静脈注射により投与すればよい。他の動物の場合も、体重60kgあたりに換算した量を投与することができる。

本発明のペプチドは、抗癌作用、つまり、癌細胞の運動抑制作用および癌転移阻害作用を有する。即ち、本発明のペプチドは、後述の実施例から明らかのように、癌転移阻害作用を有するため、癌特に癌転移に関係する予防および治療薬に用いることができる。従って、本発明におけるペプチドは、抗癌薬として、口腔癌、咽頭癌、口唇癌、舌癌、歯肉癌、鼻咽頭癌、食道癌、

- 胃癌、小腸癌、結腸癌を含む大腸癌、肝臓癌、胆のう癌、膵臓癌、鼻腔癌、肺癌、骨肉腫、軟部組織癌、皮膚癌、黒色腫、乳癌、子宮癌、卵巣癌、前立腺癌、精巣癌、陰茎癌、膀胱癌、腎臓癌、脳腫瘍、甲状腺癌、リンパ腫、白血病などの改善、予防および治療薬として有用である。また、本発明のペプチドは、抗慢性関節リウマチ作用、つまり、T細胞の運動抑制作用を有する。即ち、本発明のペプチドは、後述の実施例から明らかなように、T細胞の運動抑制作用を有するため、慢性関節リウマチに対する予防および治療薬に用いることができる。従って、本発明におけるペプチドは、慢性関節リウマチの改善、予防および治療薬として有用である。
- 10 C X C R 4 拮抗作用を有する化合物が抗ウイルス活性を有することは公知である。従って、本発明のペプチドがウイルス感染症（例、エイズ、SARSなど）の予防および治療薬としても用い得ることは当業者に自明であろう。
- 例えば、本発明のペプチドを抗癌薬として用いる場合には、他の抗癌剤（例えば、化学療法剤、免疫療法剤、または細胞増殖因子ならびにその受容体の作用を阻害する薬剤）など（以下、併用薬物と略記する）と併用して使用することができる。
- 15 本発明のペプチドは、単剤として使用しても優れた抗癌作用を示すが、さらに上記併用薬物の一つまたは幾つかと併用（多剤併用）することによって、その効果をより一層増強させることができる。
- 20 該「化学療法剤」としては、例えばアルキル化剤、代謝拮抗剤、抗癌性抗生物質、植物由来抗癌剤などが挙げられる。
- 「アルキル化剤」としては、例えば、ナイトロジェンマスタード、塩酸ナイトロジェンマスタード-N-オキシド、クロラムブチル、シクロフォスファミド、イホスファミド、チオテパ、カルボコン、トシル酸インプロスルファン、プスルファン、塩酸ニムスチン、ミトブロニトール、メルファラン、25 ダカルバジン、ラニムスチン、リン酸エストラムスチンナトリウム、トリエチレンメラミン、カルムスチン、ロムスチン、ストレプトゾシン、ピボプロマン、エトグルシド、アルトレタミン、アンバムスチン、塩酸ジブロスピジウム、フォテムスチン、プレドニムスチン、プミテパ、リボムスチン、テモ

ゾロミド、トレオスルファン、トロフォスファミド、ジノスタチンスチマラマー、カルボコン、アドゼレシン、システムスチン、ピゼレシン、白金錯体（カルボプラチン、シスプラチン、ミボプラチン、ネダプラチン、オキサリプラチンなど）などが挙げられる。

- 5 「代謝拮抗剤」としては、例えば、メルカプトプリン、6-メルカプトプリンリボシド、チオイノシン、メトトレキサート、エノシタピン、シタラビン、シタラビンオクフォスファート、塩酸アンシタピン、5-FU系薬剤（例、フルオロウラシル、テガフル、UFT、ドキシフルリジン、カルモフル、ガロシタピン、エミテフルなど）、アミノプテリン、ロイコボリンカルシウム、タブロイド、プトシン、フォリネイトカルシウム、レボフォリネイトカルシウム、クラドリピン、エミテフル、フルダラビン、ゲムシタピン、ヒドロキシカルバミド、ペントスタチン、ピリトレキシム、イドキシウリジン、ミトグアゾン、チアゾプリン、アンバムスチン、ジェミシタピンなどが挙げられる。
- 10

- 15 「抗癌性抗生物質」としては、例えば、アントラサイクリン系抗癌薬（塩酸ドキソルビシン、塩酸ダウノルビシン、塩酸アクリルビシン、塩酸ピラルビシン、塩酸エピルビシンなど）、アクチノマイシンD、アクチノマイシンC、マイトマイシンC、クロモマイシンA3、塩酸ブレオマイシン、硫酸ブレオマイシン、硫酸ペプロマイシン、ネオカルチノスタチン、ミスラマイシン、
- 20 ザルコマイシン、カルチノフィリン、ミトタン、塩酸ゾルビシン、塩酸ミトキサントロン、塩酸イダルビシンなどが挙げられる。

- 「植物由来抗癌剤」としては、例えば、ビンカアルカロイド系抗癌薬（硫酸ビンブラスチン、硫酸ビンクリスチン、硫酸ビンデシン、ビノレルピンなど）、タクサン系抗癌薬（パクリタクセル、ドセタクセルなど）、エトポシド、リン酸エトポシド、テニポシド、ビノレルピンなどが挙げられる。
- 25

該「細胞増殖因子ならびにその受容体の作用を阻害する薬剤」における、「細胞増殖因子」としては、細胞の増殖を促進する物質であればどのようなものでもよく、通常、分子量が20,000以下のペプチドで、受容体との結合により低濃度で作用が発揮される因子が挙げられ、具体的には、(1)

E G F (epidermal growth factor) またはそれと実質的に同一の活性を有する物質 [例、E G F、ハレグリン (HER 2 リガンド) など]、(2) インシュリンまたはそれと実質的に同一の活性を有する物質 [例、インシュリン、I G F (insulin-like growth factor) - 1、I G F - 2 など]、(3) 5 F G F (fibroblast growth factor) またはそれと実質的に同一の活性を有する物質 [例、酸性 F G F、塩基性 F G F、K G F (keratinocyte growth factor)、F G F - 10 など]、(4) その他の細胞増殖因子 [例、C S F (colony stimulating factor)、E P O (erythropoietin)、I L - 2 (interleukin-2)、N G F (nerve growth factor)、P D G F (platelet-derived growth factor)、T G F β (transforming growth factor β)、H G F (hepatocyte growth factor)、V E G F (vascular endothelial growth factor) など] などが挙げられる。

該「細胞増殖因子の受容体」としては、上記の細胞増殖因子と結合能を有する受容体であればいかなるものであってもよく、具体的には、E G F 受容体、ハレグリン受容体 (HER 2)、インシュリン受容体、I G F 受容体、15 F G F 受容体 - 1 または F G F 受容体 - 2、H G F 受容体 (c - m e t)、V E G F 受容体、S C F 受容体 (c - k i t) などがあげられる。

該「細胞増殖因子の作用を阻害する薬剤」としては、ハーセプチン (HER 2 抗体)、G L E E V E C (c - m e t、c - k i t、a b l 阻害薬)、20 I r e s s a (E G F 受容体阻害薬) などがあげられる。

上記の薬剤の他に、トポイソメラーゼ I 阻害薬 (例、イリノテカン、トポテカンなど)、トポイソメラーゼ II 阻害薬 (例えば、ソブゾキサンなど)、血管新生阻害薬なども用いることができる。

また、本発明のペプチドを慢性関節リウマチの予防及び／又は治療剤として用いる場合には、他の関節疾患の予防及び／又は治療剤と併用して使用25 することができる。該併用される薬剤としては、例えば、抗炎症ステロイド剤 (例、プレドニゾロン、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾロン、デキサメタゾン、ベタメタゾン等)、非ステロイド性消炎鎮痛剤 (例、インドメタシン、ジクロフェナク、ロキソプロフェン、イブプロフェン、アスピリン、

ピロキシカム、スリンダク等)あるいはヒアルロン酸製剤(例、ヒアルロン酸ナトリウム等)、COX-II阻害剤などが挙げられる。

本発明のペプチドは、単剤として使用しても優れた抗慢性関節リウマチ作用を示すが、さらに上記併用薬物の一つまたは幾つかと併用(多剤併用)

5 することによって、その効果をより一層増強させることができる。

本発明のペプチドと併用薬物との併用に際しては、本発明のペプチドと併用薬物の投与時期は限定されず、本発明のペプチドと併用薬物とを、投与対象に対し、同時に投与してもよいし、時間差をおいて投与してもよい。併用薬物の投与量は、臨床上用いられている投与量に準ずればよく、投与対象、

10 投与ルート、疾患、組み合わせ等により適宜選択することができる。

本発明のペプチドと併用薬物との投与形態は、特に限定されず、投与時に、本発明のポリペプチド又はその塩と併用薬物とが組み合わされていればよい。

このような投与形態としては、例えば、(1)本発明のペプチドと併用薬物とを同時に製剤化して得られる単一の製剤の投与、(2)本発明のペプチド

15 と併用薬物とを別々に製剤化して得られる2種の製剤の同一投与経路での同時投与、(3)本発明のペプチドと併用薬物とを別々に製剤化して得られる

2種の製剤の同一投与経路での時間差をおいての投与、(4)本発明のペプチドと併用薬物とを別々に製剤化して得られる2種の製剤の異なる投与経路での同時投与、(5)本発明のペプチドと併用薬物とを別々に製剤化して得

20 られる2種の製剤の異なる投与経路での時間差をおいての投与(例えば、本発明のペプチド→併用薬物の順序での投与、あるいは逆の順序での投与)などが挙げられる。以下、これらの投与形態をまとめて、本発明の併用剤と略記する。

本発明の併用剤は、毒性が低く、例えば、本発明のペプチド及び/又は上

25 記併用薬物を自体公知の方法に従って、薬理的に許容される担体と混合して医薬組成物、例えば錠剤(糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む)、散剤、顆粒剤、カプセル剤、(ソフトカプセルを含む)、液剤、注射剤、坐剤、徐放剤等として、経口的又は非経口的(例、局所、直腸、静脈投与等)に安全に投与することができる。注射剤は、静脈内、筋肉内、皮下、臓器内、鼻

腔内、皮内、点眼、脳内、直腸内、膣内および腹腔内、腫瘍内部、腫瘍の近位などへの投与あるいは直接病巣に投与することができる。

本発明の併用剤の製造に用いられてもよい薬理学的に許容される担体としては、前記した本発明の医薬組成物に使用されるものと同様のものを使用することができる。

本発明の併用剤における本発明のペプチドと併用薬物との配合比は、投与対象、投与ルート、疾患等により適宜選択することができる。

本発明の併用剤における併用薬物の含有量は、製剤の形態によって相違するが、通常製剤全体に対して約0.01ないし100重量%、好ましくは約0.1ないし50重量%、さらに好ましくは約0.5ないし20重量%程度である。

本発明の併用剤における担体等の添加剤の含有量は、製剤の形態によって相違するが、通常製剤全体に対して約1ないし99.99重量%、好ましくは約10ないし90重量%程度である。

以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

<製造例1：ポリペプチド TC14003 の製造>

H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH

(TC14003)

1. TC14003 保護ポリペプチド樹脂の合成

最初の14位アルギニンを導入したアルコ樹脂 Fmoc-Arg(Pbf)-Alko resin から Fmoc 基を 20%ピペリジン/DMF で除去後、13位に相当する Fmoc-Cys(Trt)-OH (2.5 eq)を加え DMF 中、DIPCDI-HOBt 法により縮合反応を行った。縮合反応の進行の程度は、Kaiser, E.ら(Anal. Biochem., 34: 595 (1970))のニンヒドリン試験により調べた。

2. 12位～1位アミノ酸の導入

以下同様にして、順次、Cit、Arg(Pbf)、Tyr(t-Bu)、Pro、DLys(Boc)、Lys(Boc)、Cit、Tyr(t-Bu)、Cys(Trt)、Nal、Arg(Pbf)、Arg(Pbf)残基を樹

脂に導入し保護基保護化ポリペプチド樹脂を得た。

3. 脱保護基、樹脂からのポリペプチドの分離及び精製

5 保護基保護化ポリペプチド樹脂は、20%ピペリジン/DMF 処理により Fmoc 基を除去し、次いで樹脂に対して 1M TMSBr-チオアニソール/TFA (トリフル
オロ酢酸)系(m-クレゾール(100 eq)、エタンジチオール(300 eq)存在下)で
25 °C、2 時間反応させた。反応混合物から樹脂を濾別し、TFA で2回洗浄し、
濾液、洗液を合わせたものを減圧濃縮し、残さに水冷乾燥エーテルを加え、
生じた沈殿物を遠心沈降とデカンテーションにより上澄みから分離した。得
られた残さを冷エーテルで洗浄し、1N 酢酸に溶解し、蒸留水で希釈した。

10 4. 空気酸化による環化

上述のポリペプチドの希釈水溶液を濃アンモニア水で pH7.5 に調整し、通
気による空気酸化を行い環化させた。本水溶液を大量分取型 HPLC (コスモジ
ール 5C18 AR-II カラム: アセトニトリル-水)およびゲルクロマトグラフィー
(Sephadex G-15、溶出液: 0.1N AcOH) により精製し、単一ピークのポリ
15 ペプチドを得、凍結乾燥した。純度は、HPLC により確認した。

<製造例 2 : TC14005 の製造>

H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH
(TC14005)

20 製造例 1 と同様の方法により TC14005 を製造した。但し、1 2 位~1 位ア
ミノ酸の導入のところで、8 位の DLys (Boc) の代わりに DCit、6 位の Cit の
代わりに Arg (Pbf) を用いた。

<製造例 3 : TC14011 の製造>

25 H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH
(TC14011)

製造例 1 と同様の方法により TC14011 を製造した。但し、1 2 位~1 位ア
ミノ酸の導入のところで、8 位の DLys (Boc) の代わりに DCit を用いた。

<製造例 4 : TC14013 の製造>

H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Cit-Cit-Cys-Arg-OH
(TC14013)

製造例 1 と同様の方法により TC14013 を製造した。但し、12位～1位ア
ミノ酸の導入のところで、11位の Arg(Pbf)の代わりに Cit を用いた。

<製造例 5 : TC14015 の製造>

H-Cit-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH
(TC14015)

製造例 1 と同様の方法により TC14015 を製造した。但し、12位～1位ア
ミノ酸の導入のところで、1位の Arg(Pbf)の代わりに Cit を用いた。

<製造例 6 : TC14017 の製造>

H-Cit-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH
(TC14017)

製造例 1 と同様の方法により TC14017 を製造した。但し、12位～1位ア
ミノ酸の導入のところで、8位の DLys(Boc)の代わりに DCit、6位の Cit の
代わりに Arg(Pbf)、1位の Arg(Pbf)の代わりに Cit を用いた。

<製造例 7 : TC14019 の製造>

H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DCit-Pro-Tyr-Cit-Cit-Cys-Arg-OH
(TC14019)

製造例 1 と同様の方法により TC14019 を製造した。但し、12位～1位ア
ミノ酸の導入のところで、11位の Arg(Pbf)の代わりに Cit、8位の
DLys(Boc)の代わりに DCit、6位の Cit の代わりに Arg(Pbf)を用いた。

<製造例 8 : TC14021 の製造>

H-Cit-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DLys-Pro-Tyr-Cit-Cit-Cys-Arg-OH
(TC14021)

製造例 1 と同様の方法により TC14021 を製造した。但し、12 位～1 位アミノ酸の導入のところで、11 位の Arg(Pbf) の代わりに Cit、6 位の Cit の代わりに Arg(Pbf)、1 位の Arg(Pbf) の代わりに Cit を用いた。

5 <製造例 9 : TC14012 の製造>

H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂
(TC14012)

1. TC14012 保護ポリペプチド樹脂の合成

10 Fmoc-Rink アミド樹脂から Fmoc 基を 20%ピペリジン/DMF で除去後、14 位に相当する Fmoc-Arg(Pbf)-OH (2.5 eq) を加え DMF 中、DIPCDI-HOBt 法により縮合反応を行った。縮合反応の進行の程度は、Kaiser, E. ら (Anal. Biochem., 34: 595 (1970)) のニンヒドリン試験により調べた。

2. 12 位～1 位アミノ酸の導入

15 以下同様にして、順次、Cys(Trt)、Cit、Arg(Pbf)、Tyr(t-Bu)、Pro、DCit、Lys(Boc)、Cit、Tyr(t-Bu)、Cys(Trt)、Nal、Arg(Pbf)、Arg(Pbf) 残基を Rink アミド樹脂に導入し、保護基保護化ポリペプチド樹脂を得た。

3. 脱保護基、樹脂からのポリペプチドの分離及び精製

20 保護基保護化ポリペプチド樹脂は、20%ピペリジン/DMF 処理により Fmoc 基を除去し、次いで樹脂に対して 1M TMSBr-チオアニソール/TFA (トリフルオロ酢酸) 系 (m-クレゾール (100 eq)、エタンジチオール (300 eq) 存在下) で 25 °C、3 時間反応させた。反応混合物から樹脂を濾別し、TFA で 2 回洗浄し、濾液、洗液を合わせたものを減圧濃縮し、残さに水冷乾燥エーテルを加え、生じた沈殿物を遠心沈降とデカンテーションにより上澄みから分離した。得られた残さを冷エーテルで洗浄し、1N 酢酸に溶解し、蒸留水で希釈した。

25 4. 空気酸化による環化

上述のポリペプチドの希釈水溶液を濃アンモニア水で pH7.5 に調整し、通気による空気酸化を行い環化させた。本水溶液を大量分取型 HPLC (コスモジール 5C18 AR-II カラム : アセトニトリル-水) およびゲルクロマトグラフィー (Sephadex G-15、溶出液 : 0.1N AcOH) により精製し、単一ピークのポリ

ペプチドを得、凍結乾燥した。純度は、HPLC により確認した。

<製造例 10 : TC14014 の製造>

H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Cit-Cit-Cys-Arg-NH₂

5 (TC14014)

製造例 9 と同様の方法により TC14014 を製造した。但し、12 位～1 位アミノ酸の導入のところで、11 位の Arg(Pbf) の代わりに Cit、8 位の DCit の代わりに DLys (Boc) を用いた。

10 <製造例 11 : TC14016 の製造>

H-Cit-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂

(TC14016)

製造例 9 と同様の方法により TC14016 を製造した。但し、12 位～1 位アミノ酸の導入のところで、8 位の DCit の代わりに DLys (Boc)、1 位の Arg (Pbf) の代わりに Cit を用いた。

<製造例 12 : TC14018 の製造>

H-Cit-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂

(TC14018)

20 製造例 9 と同様の方法により TC14018 を製造した。但し、12 位～1 位アミノ酸の導入のところで、6 位の Cit の代わりに Arg (Pbf)、1 位の Arg (Pbf) の代わりに Cit を用いた。

<製造例 13 : TC14020 の製造>

25 H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DCit-Pro-Tyr-Cit-Cit-Cys-Arg-NH₂

(TC14020)

製造例 9 と同様の方法により AcTC14020 を製造した。但し、12 位～1 位アミノ酸の導入のところで、11 位の Arg (Pbf) の代わりに Cit、6 位の Cit の代わりに Arg (Pbf) を用いた。

<製造例 14 : TC14022 の製造>

H-Cit-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DLys-Pro-Tyr-Cit-Cit-Cys-Arg-NH₂
(TC14022)

- 5 製造例 9 と同様の方法により TC14022 を製造した。但し、12 位～1 位アミノ酸の導入のところで、11 位の Arg(Pbf) の代わりに Cit、8 位の DCit の代わりに DLys(Boc)、6 位の Cit の代わりに Arg(Pbf)、1 位の Arg(Pbf) の代わりに Cit を用いた。

10 <製造例 15 : TA14001、TA14005～TA14009、TC14001 および TC14004 の製造>

H-Ala-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH
(TA14001)

- 15 H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Ala-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH
(TA14005)

H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Ala-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH
(TA14006)

H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DAla-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH
(TA14007)

- 20 H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DLys-Ala-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH
(TA14008)

H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DLys-Pro-Ala-Arg-Cit-Cys-Arg-OH
(TA14009)

- 25 H-Cit-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH
(TC14001)

H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Cit-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂
(TC14004)

製造例 1 または 9 と同様の方法により導入するアミノ酸を変更することで、
以上に示した TA14001、TA14005～TA14009、TC14001 および TC14004 を製造

することができる。

<製造例 16 : AcTC14003、AcTC14005、AcTC14011～AcTC14022 の製造>

- Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH
5 (AcTC14003)
Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH
(AcTC14005)
Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH
(AcTC14011)
10 Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Cit-Cit-Cys-Arg-OH
(AcTC14013)
Ac-Cit-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH
(AcTC14015)
Ac-Cit-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH
15 (AcTC14017)
Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DCit-Pro-Tyr-Cit-Cit-Cys-Arg-OH
(AcTC14019)
Ac-Cit-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DLys-Pro-Tyr-Cit-Cit-Cys-Arg-OH
(AcTC14021)
20 Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂
(AcTC14012)
Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Cit-Cit-Cys-Arg-NH₂
(AcTC14014)
Ac-Cit-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂
25 (AcTC14016)
Ac-Cit-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂
(AcTC14018)
Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DCit-Pro-Tyr-Cit-Cit-Cys-Arg-NH₂
(AcTC14020)

Ac-Cit-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DLys-Pro-Tyr-Cit-Cit-Cys-Arg-NH₂
(AcTC14022)

製造例 1 ~ 14 と同様の方法により、TC14003、TC14005、TC14011 ~
TC14022 のアセチル化体を製造した。但し、保護基保護化ポリペプチド樹脂
5 は、20%ピペリジン/DMF 処理により Fmoc 基を除去し、無水酢酸(100 eq)-s
リジン(100 eq) /DMF 処理によりアセチル化し、次いで樹脂に対して 1M
TMSBr-チオアニソール/TFA (トリフルオロ酢酸)系(m-クレゾール(100 eq)、
エタンジチオール(300 eq)存在下)で 25 °C、2 時間 (C末端がカルボン酸体
の場合) または 3 時間 (C末端がアミド体の場合) 反応させた。

10

<製造例 17 : ポリペプチド TE14005 の製造>

H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH
(TE14005)

1. TE14005 保護ポリペプチド樹脂の合成

15 最初の 14 位アルギニンを導入したアルコ樹脂 Fmoc-Arg(Pbf)-Alko resin
(0.74 mmol/g) 270 mg (0.2 mmol) から Fmoc 基を 20%ピペリジン/DMF で除
去後、12 位に相当する Fmoc-Cys(Trt)-OH (2.5 eq) を加え DMF 中、DIPCDI -
HOBt 法により縮合反応を行った。縮合反応の進行の程度は、Kaiser, E. ら
(Anal. Biochem., 34: 595 (1970)) のニンヒドリン試験により調べた。

20 2. 12 位 ~ 1 位アミノ酸の導入

以下同様にして、順次、Cit、Arg(Pbf)、Tyr(t-Bu)、Pro、DGlu(O-t-Bu)、
Lys(Boc)、Arg(Pbf)、Tyr(t-Bu)、Cys(Trt)、Nal、Arg(Pbf)、Arg(Pbf) 残基
を樹脂に導入し保護基保護化ポリペプチド樹脂を得た。

3. 脱保護基、樹脂からのポリペプチドの分離及び精製

25 保護基保護化ポリペプチド樹脂は、20%ピペリジン/DMF 処理により Fmoc
基を除去し、次いで樹脂 200 mg に対して 1M TMSBr-チオアニソール/TFA
(トリフルオロ酢酸)系(m-クレゾール(100 eq)、エタンジチオール(300 eq)
存在下) 10 mL で 25 °C、2 時間反応させた。反応混合物から樹脂を濾別し、
TFA 1 mL で 2 回洗浄し、濾液、洗液を合わせたものを減圧濃縮し、残さに水

冷乾燥エーテル 30 mL を加え、生じた沈殿物を遠心沈降とデカンテーションにより上澄みから分離した。得られた残さを冷エーテルで洗浄し、1N 酢酸 50 mL に溶解し、蒸留水で 250 mL に希釈した。

4. 空気酸化による環化

- 5 上述のポリペプチドの希釈水溶液を濃アンモニア水で pH7.5 に調整し、通気による空気酸化を行い環化させた。本水溶液を大量分取型 HPLC (コスモジール 5C18 AR-II カラム：アセトニトリル-水) およびゲルクロマトグラフィー (Sephadex G-15、溶出液：0.1N AcOH) により精製し、単一ピークのポリペプチドを得、凍結乾燥した。純度は、HPLC により確認した。

- 10 収量 24.1 mg (7 AcOH 塩) (21.3%)

$$[\alpha]_D^{23.6} = -5.36 \text{ (c 1.12, H}_2\text{O)}$$

イオンスプレーマスマスペクトル (IS-MS): $C_{89}H_{136}N_{32}O_{20}S_2$

計算値: 2038.38 実測値: 2038

(トリプルステージ四重極型質量分析装置 API-III E (Sciex))

15

<製造例 18 : ポリペプチド TE14001 の製造>

H-DGlu-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH
(TE14001)

- 20 製造例 17 と同様の方法により TE14001 を製造した。但し、12 位~1 位アミノ酸の導入のところで、8 位の DGlu(O-t-Bu) の代わりに DLys(Boc)、1 位の Arg(Pbf) の代わりに DGlu(O-t-Bu) を用いた。

<製造例 19 : ポリペプチド TE14002 の製造>

H-Arg-Glu-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH
25 (TE14002)

製造例 17 と同様の方法により TE14002 を製造した。但し、12 位~1 位アミノ酸の導入のところで、8 位の DGlu(O-t-Bu) の代わりに DLys(Boc)、2 位の Arg(Pbf) の代わりに Glu(O-t-Bu) を用いた。

<製造例 20 : ポリペプチド TE14003 の製造>

H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Glu-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH
(TE14003)

- 5 製造例 17 と同様の方法により TE14003 を製造した。但し、12 位～1 位
アミノ酸の導入のところで、8 位の DGlu(0-t-Bu) の代わりに DLys(Boc)、6
位の Arg(Pbf) の代わりに Glu(0-t-Bu) を用いた。

<製造例 21 : ポリペプチド TE14004 の製造>

10 H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Glu-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH
(TE14004)

- 製造例 17 と同様の方法により TE14004 を製造した。但し、12 位～1 位
アミノ酸の導入のところで、8 位の DGlu(0-t-Bu) の代わりに DLys(Boc)、7
位の Lys(Boc) の代わりに Glu(0-t-Bu) を用いた。

15 <製造例 22 : ポリペプチド TE14006 の製造>

H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DLys-Pro-Tyr-Glu-Cit-Cys-Arg-OH
(TE14006)

- 製造例 17 と同様の方法により TE14006 を製造した。但し、12 位～1 位
アミノ酸の導入のところで、8 位の DGlu(0-t-Bu) の代わりに DLys(Boc)、11
20 位の Arg(Pbf) の代わりに Glu(0-t-Bu) を用いた。

<製造例 23 : ポリペプチド TE14007 の製造>

H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Glu-OH
(TE14007)

- 25 製造例 17 と同様の方法により TE14007 を製造した。但し、最初の 14 位
アルギニンを導入したアルコ樹脂 Fmoc-Arg(Pbf)-Alko resin の代わりに最
初の 14 位グルタミン酸を導入したアルコ樹脂 Fmoc-Glu(0-t-Bu)-Alko
resin を用い、さらに 12 位～1 位アミノ酸の導入のところで、8 位の
DGlu(0-t-Bu) の代わりに DLys(Boc) を用いた。

<製造例 24 : ポリペプチド TE14011 の製造>

H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂
(TE14011)

5 1. TE14011 保護ポリペプチド樹脂の合成

Fmoc-Rink アミド樹脂から Fmoc 基を 20% ピペリジン/DMF で除去後、14 位に相当する Fmoc-Arg(Pbf)-OH (2.5 eq) を加え DMF 中、DIPCDI-HOBT 法により縮合反応を行った。縮合反応の進行の程度は、Kaiser, E. ら (Anal. Biochem., 34: 595 (1970)) のニンヒドリン試験により調べた。

10 2. 12 位～1 位アミノ酸の導入

以下同様にして、順次、Cys(Trt)、Cit、Arg(Pbf)、Tyr(t-Bu)、Pro、DGlu(O-t-Bu)、Lys(Boc)、Cit、Tyr(t-Bu)、Cys(Trt)、Nal、Arg(Pbf)、Arg(Pbf) 残基を Rink アミド樹脂に導入し、保護基保護化ポリペプチド樹脂を得た。

15 3. 脱保護基、樹脂からのポリペプチドの分離及び精製

保護基保護化ポリペプチド樹脂は、20% ピペリジン/DMF 処理により Fmoc 基を除去し、次いで樹脂に対して 1M TMSBr-チオアニソール/TFA (トリフルオロ酢酸) 系 (m-クレゾール (100 eq)、エタンジチオール (300 eq) 存在下) で 25 °C、3 時間反応させた。反応混合物から樹脂を濾別し、TFA で 2 回洗浄し、
20 濾液、洗液を合わせたものを減圧濃縮し、残さに水冷乾燥エーテルを加え、生じた沈殿物を遠心沈降とデカンテーションにより上澄みから分離した。得られた残さを冷エーテルで洗浄し、1N 酢酸に溶解し、蒸留水で希釈した。

4. 空気酸化による環化

上述のポリペプチドの希釈水溶液を濃アンモニア水で pH7.5 に調整し、通
25 気による空気酸化を行い環化させた。本水溶液を大量分取型 HPLC (コスモジール 5C18 AR-II カラム : アセトニトリル-水) およびゲルクロマトグラフィー (Sephadex G-15、溶出液 : 0.1N AcOH) により精製し、単一ピークのポリペプチドを得、凍結乾燥した。純度は、HPLC により確認した。

<製造例 2 5 : ポリペプチド TE14012 の製造>

H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-DGlu-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂
(TE14012)

- 5 製造例 2 4 と同様の方法により TE14012 を製造した。但し、1 2 位～1 位
アミノ酸の導入のところで、8 位の DGlu(O-t-Bu) の代わりに DCit、6 位の
Cit の代わりに DGlu(O-t-Bu) を用いた。

<製造例 2 6 : ポリペプチド TE14013 の製造>

10 H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-DGlu-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂
(TE14013)

- 製造例 2 4 と同様の方法により TE14013 を製造した。但し、1 2 位～1 位
アミノ酸の導入のところで、6 位の Cit の代わりに DGlu(O-t-Bu) を用いた。

<製造例 2 7 : ポリペプチド TE14014 の製造>

15 H-DGlu-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂
(TE14014)

- 製造例 2 4 と同様の方法により TE14014 を製造した。但し、1 2 位～1 位
アミノ酸の導入のところで、1 位の Arg(Pbf) の代わりに DGlu(O-t-Bu) を用い
た。

20

<製造例 2 8 : ポリペプチド TE14015 の製造>

H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-DGlu-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂
(TE14015)

- 25 製造例 2 4 と同様の方法により TE14015 を製造した。但し、1 2 位～1 位
アミノ酸の導入のところで、10 位の Tyr(t-Bu) の代わりに DGlu(O-t-Bu) を用
いた。

<製造例 2 9 : ポリペプチド TE14016 の製造>

H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-DGlu-Cys-Arg-NH₂

(TE14016)

製造例 24 と同様の方法により TE14016 を製造した。但し、12 位～1 位アミノ酸の導入のところで、12 位の Cit の代わりに DGlu(O-t-Bu) を用いた。

5 <製造例 30 : ポリペプチド AcTE14014～AcTE14016 の製造>

Ac-DGlu-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂
(AcTE14014)

Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-DGlu-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂
(AcTE14015)

10 Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-DGlu-Cys-Arg-NH₂
(AcTE14016)

製造例 27～29 と同様の方法により TE14014～TE14016 のアセチル化体を製造した。但し、保護基保護化ポリペプチド樹脂は、20%ピペリジン/DMF 処理により Fmoc 基を除去し、無水酢酸(100 eq)-s リジン(100 eq) /DMF 処理によりアセチル化し、次いで樹脂に対して 1M TMSBr-チオアニソール/TFA (トリフルオロ酢酸)系(m-クレゾール(100 eq)、エタンジチオール(300 eq)存在下)で 25℃、3 時間反応させた。

<製造例 31 : ポリペプチド TF1 の製造>

20 Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂
(TF1: AcTE14011)

製造例 24 と同様の方法により TF1 を製造した。但し、保護基保護化ポリペプチド樹脂は、20%ピペリジン/DMF 処理により Fmoc 基を除去し、無水酢酸(100 eq)-s リジン(100 eq) /DMF 処理によりアセチル化し、次いで樹脂
25 に対して 1M TMSBr-チオアニソール/TFA (トリフルオロ酢酸)系(m-クレゾール(100 eq)、エタンジチオール(300 eq)存在下)で 25℃、3 時間反応させた。

<製造例 32 : ポリペプチド TF2 の製造>

guanyl-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂

(TF2: guanyl-TE14011)

製造例 2 4 と同様の方法により TF2 を製造した。但し、保護基保護化ポリ
ペプチド樹脂は、20%ピペリジン/DMF 処理により Fmoc 基を除去し、1H-ピラ
ゾール-1-カルボキサミジン (5 eq)-, N-ジイソプロピルエチルアミン (10
5 eq) /DMF 処理によりグアニル化し、次いで樹脂に対して 1M TMSBr-チオア
ニソール/TFA (トリフルオロ酢酸)系(m-クレゾール(100 eq)、エタンジチ
オール(300 eq)存在下)で 25 °C、3 時間反応させた。

<製造例 3 3 : ポリペプチド TF3 の製造>

10 TMguanyl-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-
NH₂

(TF3: TMguanyl-TE14011)

製造例 2 4 と同様の方法により TF3 を製造した。但し、保護基保護化ポリ
ペプチド樹脂は、20%ピペリジン/DMF 処理により Fmoc 基を除去し、2-(1H-
15 ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウム テトラフ
ルオロボレート (5 eq)/DMF 処理によりテトラメチルグアニル化し、次いで
樹脂に対して 1M TMSBr-チオアニソール/TFA (トリフルオロ酢酸)系(m-クレ
ゾール(100 eq)、エタンジチオール(300 eq)存在下)で 25 °C、3 時間反応さ
せた。

20

<製造例 3 4 : ポリペプチド TF4 の製造>

TMguanyl-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂

(TF4: TMguanyl-TE14011 (2-14))

製造例 2 4 と同様の方法により TF4 を製造した。但し、1 位のアルギニン
25 を縮合しなかった。

<製造例 3 5 : ポリペプチド TF5 の製造>

4F-benzoyl-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-
NH₂

(TF5: 4F-benzoyl-TE14011)

製造例 2 4 と同様の方法により TF5 を製造した。但し、保護基保護化ポリペプチド樹脂は、20%ピペリジン/DMF 処理により Fmoc 基を除去し、4-フル
5 オロ安息香酸 (2.5 eq) を DIPCDI -HOBt 法により縮合し、次いで樹脂に対し
て 1M TMSBr-チオアニソール/TFA (トリフルオロ酢酸) 系 (m-クレゾール (100
eq)、エタンジチオール (300 eq) 存在下) で 25 °C、3 時間反応させた。

<製造例 3 6 : ポリペプチド TF6 の製造>

2F-benzoyl-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-
10 NH₂ (TF6: 2F-benzoyl-TE14011)

製造例 2 4 と同様の方法により TF6 を製造した。但し、保護基保護化ポリ
ペプチド樹脂は、20%ピペリジン/DMF 処理により Fmoc 基を除去し、2-フル
オロ安息香酸 (2.5 eq) を DIPCDI -HOBt 法により縮合し、次いで樹脂に対し
て 1M TMSBr-チオアニソール/TFA (トリフルオロ酢酸) 系 (m-クレゾール (100
15 eq)、エタンジチオール (300 eq) 存在下) で 25 °C、3 時間反応させた。

<製造例 3 7 : ポリペプチド TF7 の製造>

APA-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂
(TF7: APA-TE14011 (2-14))

20 製造例 2 4 と同様の方法により TF7 を製造した。但し、12 位~1 位アミノ
酸の導入のところで、1 位の Arg (Pbf) の代わりに、5-アミノペンタン酸
(Fmoc 保護体) を導入した。

<製造例 3 8 : ポリペプチド TF8 の製造>

25 desamino-R-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂
(TF8: desamino-R-TE14011 (2-14))

製造例 2 4 と同様の方法により TF8 を製造した。但し、12 位~1 位アミノ
酸の導入のところで、1 位の Arg (Pbf) の代わりに、5-アミノペンタン酸
(Fmoc 保護体) を導入し、さらに、保護基保護化ポリペプチド樹脂は、20%ピ

ペリジン/DMF 処理により Fmoc 基を除去し、1H-ピラゾール-1-カルボキサミジン(5 eq)-, N-ジイソプロピルエチルアミン (10 eq) /DMF 処理によりグアニル化し、次いで樹脂に対して 1M TMSBr-チオアニソール/TFA (トリフルオロ酢酸)系(m-クレゾール(100 eq)、エタンジチオール(300 eq)存在下)で
5 25 °C、3 時間反応させた。

<製造例 39 : ポリペプチド TF9 の製造>

guanylyl-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂
(TF9: guanylyl-TE14011 (2-14))

10 製造例 32 と同様の方法を用いて TF9 を製造した。但し、1 位のアルギニンを縮合しなかった。

<製造例 40 : ポリペプチド TF10 の製造>

succinyl-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂
15 (TF10: succinyl-TE14011 (2-14))

製造例 24 と同様の方法により TF10 を製造した。但し、1 位のアルギニンを縮合しなかった。また、保護基保護化ポリペプチド樹脂は、20%ピペリジン/DMF 処理により Fmoc 基を除去し、無水コハク酸(5 eq)/ピリジン処理によりヘミスクシニル化し、次いで樹脂に対して 1M TMSBr-チオアニソール
20 /TFA (トリフルオロ酢酸)系(m-クレゾール(100 eq)、エタンジチオール(300 eq)存在下)で 25 °C、3 時間反応させた。

<製造例 41 : ポリペプチド TF11 の製造>

glutaryl-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂
25 (TF11: glutaryl-TE14011 (2-14))

製造例 40 と同様の方法により TF11 を製造した。但し、保護基保護化ポリペプチド樹脂は、20%ピペリジン/DMF 処理により Fmoc 基を除去し、無水グルタル酸(5 eq)/ピリジン処理によりヘミスクシニル化し、次いで樹脂に対して 1M TMSBr-チオアニソール/TFA (トリフルオロ酢酸)系(m-クレゾール

(100 eq)、エタンジチオール(300 eq)存在下)で 25 °C、3 時間反応させた。

<製造例 4 2 : ポリペプチド TF12 の製造>

deaminoTMG-APA-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-
5 NH₂

(TF12: deaminoTMG-APA-TE14011 (2-14))

製造例 2 4 と同様の方法により TF12 を製造した。但し、12 位~1 位アミノ酸の導入のところで、1 位の Arg(Pbf)の代わりに、5-アミノペンタン酸(Fmoc 保護体)を導入し、さらに、保護基保護化ポリペプチド樹脂は、20%ピ
10 ペリジン/DMF 処理により Fmoc 基を除去し、2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウム テトラフルオロボレート (5 eq)/DMF 処理によりテトラメチルグアニル化し、次いで樹脂に対して 1M TMSBr-チオアニソール/TFA (トリフルオロ酢酸)系(m-クレゾール(100 eq)、エタンジチオール(300 eq)存在下)で 25 °C、3 時間反応させた。

15

<製造例 4 3 : ポリペプチド TF15 の製造>

R-CH₂-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂
(TF15: R-CH₂NH-RTE14011)

製造例 2 4 と同様の方法により TF15 を製造した。但し、12 位~1 位アミノ酸の導入のところで、1 位に Fmoc-Arg(Pbf)-OH を縮合する代わりに、
20 Fmoc-Arg(Pbf)-H (アルデヒド)を還元的アミノ化により縮合した (NaB(CN)H₃(3 eq), AcOH(1 eq)/DMF)。

<製造例 4 4 : ポリペプチド TF17 の製造>

H-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (TF17)
(TF17: TE14011 (2-14))

製造例 2 4 と同様の方法により TF17 を製造した。但し、1 位のアルギニンを縮合しなかった。

<製造例 4 5 : ポリペプチド TF18 の製造>

TMguanylyl-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂

(TF18: TMguanylyl-TC14012)

- 5 製造例 9 と同様の方法により TF18 を製造した。但し、保護基保護化ポリペプチド樹脂は、20%ピペリジン/DMF 処理により Fmoc 基を除去し、2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウム テトラフルオロボレート (5 eq)/DMF 処理によりテトラメチルグアニル化し、次いで
- 10 樹脂に対して 1M TMSBr-チオアニソール/TFA (トリフルオロ酢酸)系(m-クレゾール(100 eq)、エタンジチオール(300 eq)存在下)で 25 °C、3 時間反応させた。

<製造例 4 6 : ポリペプチド TF19 の製造>

ACA-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂

- 15 (TF19: ACA-TC14012)

製造例 9 と同様の方法により TF19 を製造した。但し、12 位~1 位アミノ酸の導入のところで、1 位の Arg(Pbf)の次に、6-アミノヘキサン酸 (Fmoc 保護体)を導入した。

- 20 <製造例 4 7 : ポリペプチド TF20 の製造>

ACA-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH

(TF20: ACA-T140)

- 製造例 1 7 と同様の方法により TF20 を製造した。但し、12 位~1 位アミノ酸の導入のところで、8 位の DGlu(O-t-Bu)の代わりに DLys(Boc)、1 位の
- 25 Arg(Pbf)の代わりに 6-アミノヘキサン酸 (Fmoc 保護体)を用いた。

<製造例 4 8 : ポリペプチド TZ14011 の製造>

H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Arg-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂

(TZ14011)

製造例 24 と同様の方法により TZ14011 を製造した。但し、12 位～1 位アミノ酸の導入のところで、8 位の DGlu(O-t-Bu) の代わりに DLys(Boc)、7 位の Lys(Boc) の代わりに Arg(Pbf) を用いた。

5 <製造例 49 : ポリペプチド AcTZ14011 の製造>

Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Arg-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂
(AcTZ14011)

製造例 48 と同様の方法により AcTZ14011 を製造した。但し、保護基保護化ポリペプチド樹脂は、20%ピペリジン/DMF 処理により Fmoc 基を除去し、
10 無水酢酸(100 eq)-s リジン(100 eq) /DMF 処理によりアセチル化し、次いで樹脂に対して 1M TMSBr-チオアニソール/TFA (トリフルオロ酢酸)系(m-クレゾール(100 eq)、エタンジチオール(300 eq)存在下)で 25 °C、3 時間反応させた。

15 <製造例 50 : ポリペプチド TN14003 の製造>

H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂
(TN14003)

製造例 9 と同様の方法により TN14003 を製造した。但し、12 位～1 位アミノ酸の導入のところで、8 位の DCit の代わりに DLys(Boc) を用いた。

20

<製造例 51 : ポリペプチド TN14005 の製造>

H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂
(TN14005)

製造例 9 と同様の方法により TN14005 を製造した。但し、12 位～1 位アミノ酸の導入のところで、6 位の Cit の代わりに Arg(Pbf) を用いた。
25

<製造例 52 : ポリペプチド AcTN14003 の製造>

Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂
(AcTN14003)

製造例 5 0 と同様の方法により AcTN14003 を製造した。但し、保護基保護化ポリペプチド樹脂は、20%ピペリジン/DMF 処理により Fmoc 基を除去し、無水酢酸(100 eq)-s リジン(100 eq) /DMF 処理によりアセチル化し、次いで樹脂に対して 1M TMSBr-チオアニソール/TFA (トリフルオロ酢酸)系(m-クレゾール(100 eq)、エタンジチオール(300 eq)存在下)で 25 ℃、3 時間反応させた。

<製造例 5 3 : ポリペプチド AcTN14005 の製造>

Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂
10 (AcTN14005)

製造例 5 1 と同様の方法により AcTN14005 を製造した。但し、保護基保護化ポリペプチド樹脂は、20%ピペリジン/DMF 処理により Fmoc 基を除去し、無水酢酸(100 eq)-s リジン(100 eq) /DMF 処理によりアセチル化し、次いで樹脂に対して 1M TMSBr-チオアニソール/TFA (トリフルオロ酢酸)系(m-クレゾール(100 eq)、エタンジチオール(300 eq)存在下)で 25 ℃、3 時間反応させた。

<製造例 5 4 : ポリペプチド 4F-benzoyl-TN14003 の製造>

4F-benzoyl-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂
20 (4F-benzoyl-TN14003)

1. 4F-benzoyl-TN14003 保護ポリペプチド樹脂の合成

Fmoc-Rink アミド樹脂 (0.34 mmol/g) 2.94 g (1 mmol)から Fmoc 基を 20%ピペリジン/DMF で除去後、14 位に相当する Fmoc-Arg(Pbf)-OH (2.5 eq)を加え DMF 中、DIPCDI-HOBt 法により縮合反応を行った。縮合反応の進行の程度は、Kaiser, E.ら(Anal. Biochem., 34: 595 (1970))のニンヒドリン試験により調べた。

2. 13 位~1 位アミノ酸の導入

以下同様にして、順次、Cys(Trt)、Cit、Arg(Pbf)、Tyr(t-Bu)、Pro、

DLys(Boc)、Lys(Boc)、Cit、Tyr(t-Bu)、Cys(Trt)、Nal、Arg(Pbf)、
Arg(Pbf)残基をRink アミド樹脂に導入し、最後 N 端に 4-フルオロ安息香酸
(2.5 eq)を DIPCDI -HOBt 法により縮合し、保護基保護化ポリペプチド樹脂
を得た。

5 3. 脱保護基、樹脂からのポリペプチドの分離及び精製

ポリペプチド樹脂(1 mmol)に対して 1M TMSBr-チオアニソール/TFA (トリ
フルオロ酢酸)系(m-クレゾール(100 eq)、エタンジチオール(300 eq)存在
下) 270 mL で 25 °C、3 時間反応させた。反応混合物から樹脂を濾別し、TFA
5 mL で 2 回洗浄し、濾液、洗液を合わせたものを減圧濃縮し、残さに水冷乾
10 燥エーテル 300 mL を加え、生じた沈殿物をデカンテーションにより上澄み
から分離した。得られた残さを冷エーテルで洗浄し、1N 酢酸 500 mL に溶解
し、蒸留水で 2.5 L に希釈した。

4. 空気酸化による環化

15 上述のポリペプチドの希釈水溶液を濃アンモニア水で pH7.5 に調整し、通
気による空気酸化を行い環化させた。本水溶液を大量分取型 HPLC (コスモジ
ール 5C18 AR-II カラム：アセトニトリル-水) により精製し、単一ピーク
のポリペプチドを得、凍結乾燥した。純度は、HPLC により確認した。

収量 551.5 mg (6 TFA 塩) (19.4%)

$[\alpha]_D^{28.6} = -10.25$ (c 0.39, H₂O)

20 イオンスプレーマススペクトル (IS-MS): C₉₇H₁₄₄FN₃₃O₁₉S₂

計算値: 2159.52 実測値: 2161

(トリプルステージ四重極型質量分析装置 API-III E (Sciex))

<製造例 55: ポリペプチド 4F-benzoyl-TE14011-Me の製造>

25 4-fluorobenzoyl-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-
Cys-Arg-NHMe

(4F-benzoyl-TE14011-Me)

1. 4F-benzoyl-TE14011-Me 保護ポリペプチド樹脂の合成

4-sulfamylbutyryl AM NovaGel 樹脂に、14 位に相当する Fmoc-Arg(Pbf)-

OH (4 eq)を加え CHCl_3 中、PyBOP (3 eq) -DIPEA (6 eq)法により -0°C にて縮合反応を行った (本縮合反応を 2 回行った)。この樹脂から Fmoc 基を 20% ピペリジン/DMF で除去後、13 位に相当する Fmoc-Cys(Trt)-OH (2.5 eq)を加え DMF 中、DIPCDI -HOBt 法により縮合反応を行った。縮合反応の進行の程度は、Kaiser, E. ら (Anal. Biochem., 34: 595 (1970)) のニンヒドリン試験により調べた。以下、12 位~1 位アミノ酸の導入に関して同様に、順次、Cit、Arg(Pbf)、Tyr(t-Bu)、Pro、DGlu(O-t-Bu)、Lys(Boc)、Cit、Tyr(t-Bu)、Cys(Trt)、Nal、Arg(Pbf)、Arg(Pbf) 残基を sulfamylbutyryl 樹脂に導入し、最後 N 端に 4-fluorobenzoic acid (2.5 eq) を DIPCDI -HOBt 法により縮合し、保護基保護化ポリペプチド樹脂を得た。

2. C 端アルキルアミド化、脱保護基、樹脂からのポリペプチドの分離及び精製

保護基保護化ポリペプチド樹脂を、 ICH_2CN (40 eq), DIPEA (10 eq)/NMP 処理 (48 時間) によりシアノメチル化し、次いで樹脂に対して THF/DMF 中メチルアミン (excess) を作用させ、C 端がメチルアミド化された保護基保護化ポリペプチドを樹脂から分離した。次に、保護基保護化ポリペプチドを 1 M チオアニソール/TFA (トリフルオロ酢酸) 系 (m-クレゾール (100 eq)、エタンジチオール (300 eq) 存在下) で 25°C 、3 時間反応させた。反応液を減圧濃縮し、残さに水冷乾燥エーテルを加え、生じた沈殿物を遠心沈降とデカンテーションにより上澄みから分離した。得られた残さを冷エーテルで洗浄し、1N 酢酸に溶解し、蒸留水で希釈した。

3. 空気酸化による環化

上述のポリペプチドの希釈水溶液を濃アンモニア水で pH7.5 に調整し、通気による空気酸化を行い環化させた。本水溶液を大量分取型 HPLC (コスモジール 5C18 AR-II カラム: アセトニトリル-水) およびゲルクロマトグラフィー (Sephadex G-15、溶出液: 0.1N AcOH) により精製し、単一ピークのポリペプチドを得、凍結乾燥した。純度は、HPLC により確認した。

<製造例 56: ポリペプチド 4F-benzoyl-TE14011-Et の製造>

4-fluorobenzoyl-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-
Cys-Arg-NHEt
(4F-benzoyl-TE14011-Et)

製造例 5 5 と同様の方法により 4F-benzoyl-TE14011-Et を製造した。但し、
5 メチルアミンの代わりにエチルアミンを用いた。

<製造例 5 7 : ポリペプチド : 4F-benzoyl-TE14011-iPr の製造>

4-fluorobenzoyl-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-
Cys-Arg-NHiPr
10 (4F-benzoyl-TE14011-iPr)

製造例 5 5 と同様の方法により 4F-benzoyl-TE14011-iPr を製造した。但
し、メチルアミンの代わりにイソプロピルアミンを用いた。

<製造例 5 8 : ポリペプチド 4F-benzoyl-TE14011-tyramine の製造>

15 4-fluorobenzoyl-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-
Cys-Arg-tyramine
(4F-benzoyl-TE14011-tyramine)

製造例 5 5 と同様の方法により 4F-benzoyl-TE14011-tyramine を製造した。
但し、メチルアミンの代わりにチラミン (p-ヒドロキシフェニルエチルアミ
20 ン) を用いた。

<試験例 1 : CXCL12 の CXCR4 受容体への結合に対する、本発明のポリペプチ
ドの阻害活性>

アッセイプレートにバッファー (0.5% BSA, 20mM HEPES を含む
25 Dulbecco's PBS 溶液 (pH 7.0)) にて 6×10^6 cells/mL に調製した
Jurkat ヒト T 細胞白血病細胞 を 50 μ L、バッファーにて希釈した被検化合
物 (表 1 ; 各化合物は酢酸塩の形で合成したものをを用いた) と 200 pM 125 I-
CXCL12 溶液 をそれぞれ 25 μ L 分注し、室温で 1 時間反応させ結合反応を行
った。反応後、反応溶液を 96 ウェル GF/C フィルタープレートにて吸引

濾過し、各 well の放射活性をトップカウントで測定した。被検化合物を添加しない場合の放射活性を 100%、放射標識していない CXCL12 を 100nM 添加した場合の放射活性を 0% として各被検化合物の阻害活性を求めた。結果を以下の表 1 に示す。

5

表 1

No.	IC50 (nM)	No.	IC50 (nM)	No.	IC50 (nM)
TE14002	680	TF1	11	TF11	630
TE14003	5	TF2	3.3	TF12	4.6
TE14004	6.8	TF3	9.6	TF13	21
TE14005	2.2	TF4	9.9	TF14	49
TE14006	5.6	TF5	2.8	TF15	95
TE14011	2.9	TF6	3.9	TF17	79
TE14012	5.4	TF7	5.7	TF18	8
TE14013	9.3	TF8	8.2	TF19	4.5
4F-benzoyl-TN14003	0.99	TF9	250	TF20	3.5
		TF10	48		

表 1 の結果から、本化合物は強い結合阻害活性を有することが示された。

10

<試験例 2 : CXCL12 によって誘導される乳癌細胞遊走性に対する TE-14005 の阻害活性>

トランスウエルフィルター (ポリカーボネートフィルター、8 μ m 径、Costar 社) を 10 μ g/mL フィブロネクチン溶液中に 37℃ で 6 時間処理した後、風乾した。トランスウエルの下室に CXCL12 (R&D システムズ社) 100 nM および被検物質を含むバッファー A (0.1% ウシ血清アルブミン、12 mM HEPES を含む DMEM (Gibco BRL)) を 600 μ L/穴加えた。上室に被検物質およびヒト乳癌 MDA-MB-231 細胞 (アメリカンティッシュカルチャーコレクションより購入)、 2×10^6

15

cells/mLを含むバッファーAを1.00 μ L/穴加えた。37℃、5% CO₂インキュベーター内で15時間培養後、フィルターの上面をふき取り細胞を除去し、0.5%クリスタルバイオレット（和光純薬）を含む25%メタノール溶液によりフィルター下面の細胞を固定および染色し、蒸留水で洗った後風乾した。フィルター部分を切り離し、0.1Mクエン酸ナトリウム/50%エタノール溶液を加え、クリスタルバイオレットを溶かし出し、550 nmの吸光度を測定した。結果を図1に示す。Control（－）はCXCL12を添加しない場合の遊走性を示す。CXCL12を添加することによりMDA-MB-231細胞の遊走性は亢進した。このCXCL12で誘導されるMDA-MB-231細胞の遊走性をアンタゴニスト、TE14005は10 nMまで阻害した。

＜試験例3：CXCL12のCXCR4受容体への結合に対する、TC14012及びTN14003の阻害活性＞

アッセイプレートにバッファー（0.5% BSA, 20mM HEPESを含むDulbecco's PBS溶液（pH 7.0））にて6 x10⁶ cells/mLに調製したJurkat ヒトT細胞白血病細胞を50 μ L、バッファーにて希釈した被検化合物（表2；各化合物は酢酸塩の形で合成したものを用いた）と200 pM ¹²⁵I-CXCL12溶液をそれぞれ25 μ L分注し、室温で1時間反応させ結合反応を行った。反応後、反応溶液を96ウェルGF/Cフィルタープレートにて吸引濾過し、各wellの放射活性をトップカウントで測定した。被検化合物を添加しない場合の放射活性を100%、放射標識していないCXCL12を100nM添加した場合の放射活性を0%として各被検化合物の阻害活性を求めた。結果を以下の表2に示す。

表2

No.	IC ₅₀ (nM)
TC14012	2.7
TN14003	2.6

表2の結果から、本化合物は強い結合阻害活性を有することが示された。

＜試験例4：CXCL12によって誘導される乳癌細胞遊走性に対するTC-14012の阻害活性＞

5 トランスウエルフィルター（ポリカーボネートフィルター、8 μ m径、Costar社）を10 μ g/mL フィブロネクチン溶液中に37℃で6時間処理した後、風乾した。トランスウエルの下室にCXCL12（R&Dシステムズ社）100 nM および被検物質を含むバッファーA（0.1%ウシ血清アルブミン、12 mM HEPESを含むDMEM（GibcoBRL）を600 μ L/穴加えた。上室に被検物質およびヒト乳癌MDA-MB-231細胞（アメリカンティッシュカルチャーコレクションより購入）、 2×10^6 cells/mLを含むバッファーAを100 μ L/穴加えた。37℃、5% CO₂インキュベーター内で15時間培養後、フィルターの上面をふき取り
10 細胞を除去し、0.5%クリスタルバイオレット（和光純薬）を含む25%メタノール溶液によりフィルター下面の細胞を固定および染色し、蒸留水で洗った後風乾した。フィルター部分を切り離し、0.1 Mクエン酸ナトリウム/50%エタノール溶液を加え、クリスタルバイオレットを溶かし出し、550 nmの吸光度を測定した。結果を図2に示す。Control（-）
15 はCXCL12を添加しない場合の遊走性を示す。Control（+）はCXCL12を添加した場合の遊走性を示す。CXCL12を添加することによりMDA-MB-231細胞の遊走性は亢進した。このCXCL12で誘導されるMDA-MB-231細胞の遊走性をアンタゴニスト、TC-14012は10 nMまで阻害した。

25

＜試験例5：CXCL12によって誘導されるT細胞由来白血病細胞遊走性に対する4Fbenzoyl-TN-14003の阻害活性＞

トランスウエル（ポリカーボネートフィルター、8 μ m径、Costar社）の下室にCXCL12（R&Dシステムズ社）30 nM および被検物質

を含むバッファーA (0.1%ウシ血清アルブミン、12mM HEPES
を含むDMEM (GibcoBRL) を600 μ L/穴加えた。上室に被検
物質およびヒトT細胞由来白血病細胞SUP-T1細胞 (アメリカンティッ
5 含むバッファーAを100 μ L/穴加えた。37 $^{\circ}$ C、5%CO₂インキュー
ター内で4時間培養後、下室に移動した細胞数をコールターカウンターを用
いて測定した。結果を図3に示す。Control (-) はCXCL12を
添加しない場合の遊走性を示す。Control (+) はCXCL12を添
加した場合の遊走性を示す。CXCL12を添加することによりSUP-T
10 1細胞の遊走性は亢進した。このCXCL12で誘導されるSUP-T1細
胞の遊走性をアンタゴニスト、4Fbenzoyl-TN-14003は1
0nMまで阻害した。以上より、4Fbenzoyl-TN-14003は
T細胞の運動性を低濃度で阻害することより、慢性関節リウマチの阻害薬
として有用であると考えられる。

15

<試験例6: CXCL12によって誘導される乳癌細胞遊走性に対する4F
-benzoyl-TN-14003の阻害活性>

トランスウエルフィルター (ポリカーボネートフィルター、8 μ m径、C
ostar社) を10 μ g/mL フィブロネクチン溶液中に37 $^{\circ}$ Cで一晩処理し
20 た後、風乾した。トランスウエルの下室にCXCL12 (R&Dシステムズ社) 1
00nM および4F-benzoyl-TN-14003を含むバッファ
ーA (0.1%ウシ血清アルブミン、12mM HEPESを含むDMEM
(GibcoBRL) を600 μ L/穴加えた。上室に4Fbenzoyl
-TN-14003およびヒト乳癌MDA-MB-231細胞 (アメリカン
25 ティッシュカルチャーコレクションより購入)、2 \times 10⁶cells/
mLを含むバッファーAを100 μ L/穴加えた。37 $^{\circ}$ C、5%CO₂インク
ュベーター内で15時間培養後、フィルターの上面をふき取り細胞を除去し、
0.5%クリスタルバイオレット (和光純薬) を含む25%メタノール溶液
によりフィルター下面の細胞を固定および染色し、蒸留水で洗った後風乾し

た。フィルター部分を切り離し、0.1Mクエン酸ナトリウム/50%エタノール溶液を加え、クリスタルバイオレットを溶かし出し、550nmの吸光度を測定した。結果を図4に示す。Control(−)はCXCL12を添加しない場合の遊走性を示す。Control(+)はCXCL12を添加した場合の遊走性を示す。CXCL12を添加することによりMDA-MB-231細胞の遊走性は亢進した。このCXCL12で誘導されるMDA-MB-231細胞の遊走性をアンタゴニスト、4Fbenzoyl-TN-14003は100nMまで阻害した。

10 <試験例7：4Fbenzoyl-TN-14003の抗転移活性>

5 週齢雌のCB-17 SCIDマウス（日本クレア）に 10^6 個のMDA-MB-231ヒト乳癌細胞を尾静脈より移植した。4Fbenzoyl-TN-14003を生理的食塩水で80mg/mLに調製し、徐放的浸透圧ポンプ（アルゼットポンプ、アルザ社、2週間徐放用）に封入し（投与量としてはそれぞれ、18.2 mg/kg/day 相当）、移植前日にマウス背部皮下に装着した。さらに、移植14日後に同用量薬物を含むアルゼットポンプを追加装着した。対照群には生理的食塩水を注入したアルゼットポンプを追加装着した。移植28日後、マウスを解剖し、気管より0.2%エバンスブルー溶液約2mLを注入し、肺を染色した。肺を取り出し、Bouin's液中に浸し、染色、固定した。転移巣（黄色に染色される部分）を目視で観察することにより明確な抗転移活性があるか否かを判断した。結果を図5に示す。対照群の肺においては黄色に染色される部分が一様に認められ肺への転移が観察された。一方、4Fbenzoyl-TN-14003投与群においては黄色に染色される割合が少ない症例が観察された。相対的に、4Fbenzoyl-TN-14003投与群においては転移が抑制されていることが観察された。

<試験例8：CXCL12によって誘導されるヒトT細胞株（Jurkat）およびマウス脾細胞の遊走性に対する4Fbenzoyl-TN14003の阻

害活性>

1. ヒト T 細胞株の遊走反応に及ぼす影響

RPMI-1640 およびウシ胎児血清(FCS)は BioWhittaker より、penicillin-streptomycin 溶液、RPMI-1640 (フェノールレッド不含) および HEPES は
5 Invitrogen より、BSA は Sigma より、ヒト SDF-1 α (CXCL12) は Genzyme より購入した。ヒト T リンパ球細胞株 Jurkat は ATCC より購入し、RPMI-1640 10% FCS 中で培養した。4F-benzoyl-TN14003 は PBS に溶解して実験に供した。

24 穴 Transwell (Costar, polycarbonate 膜、ポアサイズ 5 μm) を用いて遊走反応を行った。Transwell 下層に SDF-1 α (最終濃度 1 ng/mL) 600
10 μL を添加し、 5×10^5 個の細胞 (200 μL) を insert に加え、37°C で 4 時間反応させた。細胞は薬物と 37°C で 30 分プレインキュベートした。遊走反応は 20 mmol/L HEPES、0.5% BSA 含有の RPMI-1640 培地中で行った。下層に遊走した細胞を回収し、細胞数を Coulter Counter を用いて計測した。各濃度の薬物による遊走反応に対する抑制率(%)は次式から求め、その抑制率から
15 IC_{50} 値を算出した。

$$\text{抑制率(\%)} = 100 \times \left(1 - \frac{\text{各濃度薬物存在下の遊走細胞数} - \text{SDF-1}\alpha \text{非存在下遊走細胞数}}{\text{薬物非存在下の遊走細胞数} - \text{SDF-1}\alpha \text{非存在下遊走細胞数}} \right)$$

その結果、図 6 に示される通り、Jurkat 細胞は SDF-1 α に対して強い細胞
20 遊走反応性を示した。4F-benzoyl-TN14003 は本反応を濃度依存的に抑制し、その IC_{50} 値は 0.65 nmol/L であった。

2. マウス脾細胞の遊走反応に及ぼす影響

BALB/c マウス (雄、日本チャールスリバー) より脾臓を採取し、単細胞浮
25 遊液とし、赤血球を破碎して脾細胞を調製した。

Transwell (ポアサイズ 5 μm) 下層に SDF-1 α (Peprotech、最終濃度 100 ng/mL) を添加し、 1×10^6 /well の細胞 (100 μL) を insert に加え、37°C で 2.5 時間反応させた。細胞は薬物と 37°C で 30 分プレインキュベートした。遊走反応は 20 mmol/L HEPES、0.5% BSA 含有の RPMI-1640 培地中で行った。

下層に遊走した細胞数は Coulter Counter を用いて計測した。前項と同様に、各濃度の薬物による遊走反応の抑制率および阻害作用の IC_{50} 値を算出した。

その結果、図 7 に示される通り、4F-benzoyl-TN14003 は SDF-1 α に対するマウス脾細胞の遊走反応に対して濃度依存的な抑制作用を示した。その IC_{50} 値は 0.54 nmol/L であり、ヒト細胞の場合と同程度の阻害作用を示した。このことより、本ペプチドに関してはヒトとマウス間で種差がほとんどないことが確認された。

＜試験例 9：マウス遅延型過敏反応（DTH）に及ぼす 4F-benzoyl-TN14003 の影響＞

綿羊保存血は日本生物材料センターより購入した。綿羊保存血は生理食塩液で 2 回洗浄し、生理食塩液に懸濁してヒツジ赤血球（SRBC）として用いた。SRBC 懸濁液 1.0×10^9 cells/mL を 14 倍量の蒸留水で溶血した時のオキシヘモグロビンの OD541 nm 値がほぼ 0.700 に相当するとされているので、SRBC 密度はそれに応じて調製した。

BALB/c マウス（雄、6 週齢、日本チャールスリバー）の左後肢足蹠に 2×10^7 cells/50 μ l の SRBC を皮下投与して感作した。5 日後右後肢足蹠に 10^8 cells/50 μ l の SRBC を皮下投与し DTH 反応を誘発した。抗原誘発の直前および 24 時間後に右後肢足蹠の厚さをデジタルマイクロメーター（ミットヨ CD-15B）を用いて測定し、腫脹による足蹠の厚みの増加（mm）を DTH 反応の指標とした。

4F-benzoyl-TN14003 は PBS に溶解し、Alzet 浸透圧ポンプ（Alza、0.5 μ L/hr 7 日間持続型）を用いて持続的に投与した。浸透圧ポンプは感作前日にエーテル麻酔下で背部皮下に埋め込んだ。対照として PBS を注入したポンプを同様に埋め込んだ。4F-benzoyl-TN14003 は 4.8、24 および 120 μ g/day の用量を投与した。

データは平均値 \pm 標準誤差（n=7）として表した。Williams 検定で行い、 $p \leq 0.025$ を有意とした。

その結果、図 8 に示される通り、4F-benzoyl-TN14003（4.8、24 および

120 $\mu\text{g/day}$) は用量依存的かつ有意に足蹠浮腫を抑制し、その抑制率は各々9、31 および51%であった。このことより、CXCR 4がDTH反応等の細胞性免疫において重要な役割を果たしていることが示唆された。

5 <試験例10：マウスコラーゲン関節炎に対する4Fbenzoyl-TN14003の治療効果>

FK-506 は自体公知の方法 (Kino T. et al., J. Antibiot., 1987 40(9): 1249-55) により精製した。Methotrexate は和光純薬より、indomethacin は Sigma より、ウシII型コラーゲンはコラーゲン技術研修会より、Freund's
10 complete adjuvant (FCA) は Difco より、抗マウス IgG2a 抗体は Zymed よりそれぞれ購入した。

ウシII型コラーゲンを 0.05 mol/L の酢酸溶液で 2 mg/mL の濃度に溶解し、等量の FCA でエマルジョンを調製した。DBA/1JN マウス (雄、6 週齢、日本チャールスリバー) の尾根部皮内に 50 μL のエマルジョンを接種して感作
15 した。21 日後に同様に追加免疫を行った。追加免疫から 2 週にわたり体重および後肢踵厚みの測定ならびに関節炎スコアリングを行った。関節炎スコアは各肢 0-3 点でスコア化し、その合計 (12 点満点) で評価した (0, 正常; 1, 軽度の腫脹または単指の腫脹; 2, 中程度の腫脹または複数指の腫脹; 3, 重度の腫脹)。追加免疫の 2 週後に四肢および血清を採取した。

20 ウシII型コラーゲン (10 $\mu\text{g/mL}$ PBS 溶液) をイムノプレートにコート、ブロッキングした後、1000 倍希釈したマウス血清を 100 μL 添加し、室温で 2 時間放置した。洗浄後抗マウス IgG2a 抗体 (1000 倍希釈) を添加した。洗浄後 TMB を添加し、室温で 30 分放置後 H_2SO_4 を等量添加し、A450nm を測定した。

Indomethacin (1 mg/kg)、methotrexate (3 mg/kg) および FK-506 (10
25 mg/kg) は 0.5% メチルセルロースに懸濁し、0.1 mL/10g 体重の容量で追加免疫当日から 2 週間毎日経口投与した。対照群には同容量の 0.5% メチルセルロース液を経口投与した。4F-benzoyl-TN14003 は PBS に溶解し、Alzet 浸透圧ポンプ (Alza、0.5 $\mu\text{L/hr}$ 2 週間) を用いて持続的に投与した。浸透圧ポンプは追加免疫前日にエーテル麻酔下にマウス背部皮下に埋め込んだ。対

照として PBS を注入したポンプを同様に埋め込んだ。各薬物の評価は追加免疫 2 週後の値をもって行った。

データは平均値±標準誤差 (n=8-12) として表した。2 群間の比較は Student's t 検定にて行い、 $p \leq 0.05$ を有意とした。多重比較は Dunnett 検定
5 にて行い、 $p \leq 0.05$ を有意とした。

その結果、Indomethacin (1mg/kg, p.o.)、methotrexate (3 mg/kg, p.o.) および FK-506 (10mg/kg, p.o.) はいずれも後肢腫脹を有意に抑制し、関節炎スコアに対しては有意または明らかな抑制作用を示した (図 9)。

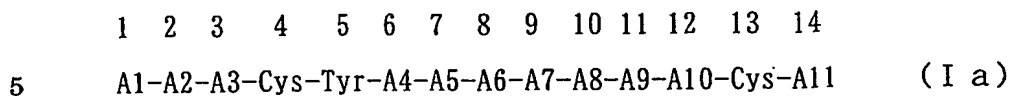
4F-benzoyl-TN14003 (120 μ g /day) は、後肢腫脹、関節炎スコアおよび体重減少に対して有意な抑制作用を示した。また、抗 II 型コラーゲン特異的 IgG2a 抗体価の増加に対して抑制傾向を示した (図 10)。これらの抑制
10 効果は上記既存薬と同等もしくはそれ以上であった。

産業上の利用可能性

15 CXCR4 拮抗作用を有する本発明のペプチド性化合物は、CXCR4 と CXCL12/SDF-1 α との結合を阻害することから、CXCR4 を発現している癌種、例えば、口腔癌、咽頭癌、口唇癌、舌癌、歯肉癌、鼻咽頭癌、食道癌、胃癌、小腸癌、結腸癌を含む大腸癌、肝臓癌、胆のう癌、膵臓癌、鼻腔癌、肺癌、骨肉腫、軟部組織癌、皮膚癌、黒色腫、乳癌、子宮癌、
20 卵巣癌、前立腺癌、精巣癌、陰茎癌、膀胱癌、腎臓癌、脳腫瘍、甲状腺癌、リンパ腫、白血病などの癌細胞の遊走反応を抑制することができ、これらの癌に対しての予防及び／又は治療薬として有用である。また、本発明のペプチド性化合物は、CXCL12/SDF-1 α によって誘導される免疫細胞の遊走反応を抑制することができ、慢性関節リウマチの予防及び／又は治療薬として有用である。
25

請求の範囲

1. 下記式 (I a)



(式中、

A 1 は、N末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン若しくはグルタミン酸残基であるか、又は欠失しており；

10 A 2 は、A 1 がN末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン若しくはグルタミン酸残基である場合には、アルギニンまたはグルタミン酸残基を表し、A 1 が欠失している場合には、N末端で誘導体化されていてもよいアルギニン又はグルタミン酸残基を表し；

15 A 3 は、芳香族アミノ酸残基を表し；

A 4、A 5 及び A 9 は、独立して、アルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン又はグルタミン酸残基を表し；

A 6 は、プロリン、グリシン、オルニチン、リジン、アラニン、シトルリン、アルギニン又はグルタミン酸残基を表し；

20 A 7 は、プロリン、グリシン、オルニチン、リジン、アラニン、シトルリン又はアルギニン残基を表し；

A 8 は、チロシン、フェニルアラニン、アラニン、ナフチルアラニン、シトルリン又はグルタミン酸残基を表し；

25 A 1 0 は、シトルリン、グルタミン酸、アルギニン又はリジン残基を表し；

A 1 1 は、C末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、グルタミン酸、リジン又はシトルリン残基を表し；

上記式中、C y s はシステイン残基を表し、T y r はチロシン残基を表し、4位と13位のシステイン残基はジスルフィド結合により連結していてもよ

く、アミノ酸はL体であってもD体であってもよい)で示されるペプチド又はその塩を含有してなる、癌または慢性関節リウマチの予防及び／又は治療剤。

5 2. 上記式 (I a) において、

A 1 は、N末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、シトルリン、アラニン若しくはグルタミン酸残基であるか、又は欠失しており；

A 2 は、A 1 がN末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、シトルリン、アラニン若しくはグルタミン酸残基である場合には、アルギニンまたは
10 グルタミン酸残基を表し、A 1 が欠失している場合には、N末端で誘導体化されていてもよいアルギニン又はグルタミン酸残基を表し；

A 4 は、アルギニン、シトルリン、アラニン又はグルタミン酸残基を表し；

A 5 は、アルギニン、シトルリン、アラニン、リジン又はグルタミン酸残
15 基を表し；

A 6 は、リジン、アラニン、シトルリン又はグルタミン酸残基を表し；

A 7 は、プロリン又はアラニン残基を表し；

A 8 は、チロシン、アラニン又はグルタミン酸残基を表し；

A 9 は、アルギニン、シトルリン又はグルタミン酸残基を表し；

20 A 10 は、シトルリン又はグルタミン酸残基を表し；

A 11 は、C末端で誘導体化されていてもよいアルギニン又はグルタミン酸残基を表すものである、請求項 1 記載の予防及び／又は治療剤。

3. 下記式 (I b)

25 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
B1-B2-B3-Cys-Tyr-B4-B5-B6-B7-B8-B9-B10-Cys-B11 (I b)

(式中、

B 1 は、N末端で誘導体化されていてもよいグルタミン酸残基であるか、又は欠失しており；

B 2 は、B 1 が N 末端で誘導体化されていてもよいグルタミン酸残基である場合には、アルギニンまたはグルタミン酸残基を表し、B 1 が欠失している場合には、N 末端で誘導体化されていてもよいアルギニン又はグルタミン酸残基を表し；

5 B 3 は、芳香族アミノ酸残基を表し；

B 4、B 5 及び B 9 は、独立して、アルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン又はグルタミン酸残基を表し；

B 6 は、プロリン、グリシン、オルニチン、リジン、アラニン、シトルリン、アルギニン又はグルタミン酸残基を表し；

10 B 7 は、プロリン、グリシン、オルニチン、リジン、アラニン、シトルリン又はアルギニン残基を表し；

B 8 は、チロシン、フェニルアラニン、アラニン、ナフチルアラニン、シトルリン又はグルタミン酸残基を表し；

15 B 10 は、シトルリン、グルタミン酸、アルギニン又はリジン残基を表し；

B 11 は、C 末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、グルタミン酸、リジン又はシトルリン残基を表し；

上記式中、C y s はシステイン残基を表し、T y r はチロシン残基を表し、4 位と 13 位のシステイン残基はジスルフィド結合により連結していてもよく、アミノ酸は L 体であっても D 体であってもよい) で示されるペプチド又はその塩。

20

4. B 1 は、N 末端で誘導体化されていてもよいグルタミン酸残基である、請求項 3 記載のペプチド又はその塩。

25

5. 下記式 (I c)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

C1-C2-C3-Cys-Tyr-C4-C5-C6-C7-C8-C9-C10-Cys-C11 (I c)

(式中、

C 1 は、N末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン若しくはグルタミン酸残基であるか、又は欠失しており；

5 C 2 は、C 1 がN末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン若しくはグルタミン酸残基である場合には、グルタミン酸残基を表し、C 1 が欠失している場合には、N末端で誘導体化されていてもよいグルタミン酸残基を表し；

C 3 は、芳香族アミノ酸残基を表し；

10 C 4、C 5 及びC 9 は、独立して、アルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン又はグルタミン酸残基を表し；

C 6 は、プロリン、グリシン、オルニチン、リジン、アラニン、シトルリン、アルギニン又はグルタミン酸残基を表し；

C 7 は、プロリン、グリシン、オルニチン、リジン、アラニン、シトルリン又はアルギニン残基を表し；

15 C 8 は、チロシン、フェニルアラニン、アラニン、ナフチルアラニン、シトルリン又はグルタミン酸残基を表し；

C 1 0 は、シトルリン、グルタミン酸、アルギニン又はリジン残基を表し；

20 C 1 1 は、C末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、グルタミン酸、リジン又はシトルリン残基を表し；

上記式中、C y s はシステイン残基を表し、T y r はチロシン残基を表し、4 位と1 3 位のシステイン残基はジスルフィド結合により連結していてもよく、アミノ酸はL 体であってもD 体であってもよい) で示されるペプチド又はその塩。

25

6. 下記式 (I d)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

D1-D2-D3-Cys-Tyr-D4-D5-D6-D7-D8-D9-D10-Cys-D11 (I d)

(式中、

D 1 は、N末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン若しくはグルタミン酸残基であるか、又は欠失しており；

5 D 2 は、D 1 がN末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン若しくはグルタミン酸残基である場合には、アルギニンまたはグルタミン酸残基を表し、D 1 が欠失している場合には、N末端で誘導体化されていてもよいアルギニン又はグルタミン酸残基を表し；

D 3 は、芳香族アミノ酸残基を表し；

10 D 4 は、グルタミン酸残基を表し；

D 5 及びD 9 は、独立して、アルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン又はグルタミン酸残基を表し；

D 6 は、プロリン、グリシン、オルニチン、リジン、アラニン、シトルリン、アルギニン又はグルタミン酸残基を表し；

15 D 7 は、プロリン、グリシン、オルニチン、リジン、アラニン、シトルリン又はアルギニン残基を表し；

D 8 は、チロシン、フェニルアラニン、アラニン、ナフチルアラニン、シトルリン又はグルタミン酸残基を表し；

20 D 10 は、シトルリン、グルタミン酸、アルギニン又はリジン残基を表し；

D 11 は、C末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、グルタミン酸、リジン又はシトルリン残基を表し；

上記式中、C y s はシステイン残基を表し、T y r はチロシン残基を表し、4位と13位のシステイン残基はジスルフィド結合により連結していてもよく、アミノ酸はL体であってもD体であってもよい) で示されるペプチド又はその塩。

25

7. 下記式 (I e)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

E1-E2-E3-Cys-Tyr-E4-E5-E6-E7-E8-E9-E10-Cys-E11 (I e)

(式中、

5 E 1 は、N末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン若しくはグルタミン酸残基であるか、又は欠失しており；

E 2 は、E 1 がN末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン若しくはグルタミン酸残基である場合には、アルギニンまたはグルタミン酸残基を表し、E 1 が欠失している場合には、N末端で誘導体化されていてもよいアルギニン又はグルタミン酸残基を
10 表し；

E 3 は、芳香族アミノ酸残基を表し；

E 4 及びE 9 は、独立して、アルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン又はグルタミン酸残基を表し；

E 5 は、アルギニン又はグルタミン酸残基を表し；

15 E 6 は、プロリン、グリシン、オルニチン、リジン、アラニン、シトルリン、アルギニン又はグルタミン酸残基を表し；

E 7 は、プロリン、グリシン、オルニチン、リジン、アラニン、シトルリン又はアルギニン残基を表し；

E 8 は、チロシン、フェニルアラニン、アラニン、ナフチルアラニン、シ
20 トルリン又はグルタミン酸残基を表し；

E 1 0 は、シトルリン、グルタミン酸、アルギニン又はリジン残基を表し；

E 1 1 は、C末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、グルタミン酸、リジン又はシトルリン残基を表し；

25 上記式中、C y s はシステイン残基を表し、T y r はチロシン残基を表し、4位と13位のシステイン残基はジスルフィド結合により連結していてもよく、アミノ酸はL体であってもD体であってもよい)で示されるペプチド又はその塩。

8. E 5 は、グルタミン酸残基を表す、請求項 7 記載のペプチド又はその塩。

9. 下記式 (I f)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

5 F1-F2-F3-Cys-Tyr-F4-F5-F6-F7-F8-F9-F10-Cys-F11 (I f)

(式中、

F 1 は、N末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン若しくはグルタミン酸残基であるか、又は欠失しており；

10 F 2 は、F 1 がN末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン若しくはグルタミン酸残基である場合には、アルギニンまたはグルタミン酸残基を表し、F 1 が欠失している場合には、N末端で誘導体化されていてもよいアルギニン又はグルタミン酸残基を表し；

15 F 3 は、芳香族アミノ酸残基を表し；

F 4、F 5 及び F 9 は、独立して、アルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン又はグルタミン酸残基を表し；

F 6 は、グルタミン酸残基を表し；

20 F 7 は、プロリン、グリシン、オルニチン、リジン、アラニン、シトルリン又はアルギニン残基を表し；

F 8 は、チロシン、フェニルアラニン、アラニン、ナフチルアラニン、シトルリン又はグルタミン酸残基を表し；

F 1 0 は、シトルリン、グルタミン酸、アルギニン又はリジン残基を表し；

25 F 1 1 は、C末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、グルタミン酸、リジン又はシトルリン残基を表し；

上記式中、C y s はシステイン残基を表し、T y r はチロシン残基を表し、4 位と 1 3 位のシステイン残基はジスルフィド結合により連結していてもよく、アミノ酸はL体であってもD体であってもよい) で示されるペプチド又

はその塩。

10. 下記式 (I g)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

5 G1-G2-G3-Cys-Tyr-G4-G5-G6-G7-G8-G9-G10-Cys-G11 (I g)

(式中、

G1は、N末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン若しくはグルタミン酸残基であるか、又は欠失しており；

10 G2は、G1がN末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン若しくはグルタミン酸残基である場合には、アルギニンまたはグルタミン酸残基を表し、G1が欠失している場合には、N末端で誘導体化されていてもよいアルギニン又はグルタミン酸残基を表し；

15 G3は、芳香族アミノ酸残基を表し；

G4、G5及びG9は、独立して、アルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン又はグルタミン酸残基を表し；

G6は、プロリン、グリシン、オルニチン、リジン、アラニン、シトルリン、アルギニン又はグルタミン酸残基を表し；

20 G7は、プロリン、グリシン、オルニチン、リジン、アラニン、シトルリン又はアルギニン残基を表し；

G8は、グルタミン酸残基を表し；

G10は、シトルリン、グルタミン酸、アルギニン又はリジン残基を表し；

25 G11は、C末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、グルタミン酸、リジン又はシトルリン残基を表し；

上記式中、Cysはシステイン残基を表し、Tyrはチロシン残基を表し、4位と13位のシステイン残基はジスルフィド結合により連結していてもよく、アミノ酸はL体であってもD体であってもよい)で示されるペプチド又

はその塩。

1 1. 下記式 (I h)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

5 H1-H2-H3-Cys-Tyr-H4-H5-H6-H7-H8-H9-H10-Cys-H11 (I h)

(式中、

H 1 は、N末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン若しくはグルタミン酸残基であるか、又は欠失しており；

10 H 2 は、H 1 がN末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン若しくはグルタミン酸残基である場合には、アルギニンまたはグルタミン酸残基を表し、H 1 が欠失している場合には、N末端で誘導体化されていてもよいアルギニン又はグルタミン酸残基を表し；

15 H 3 は、芳香族アミノ酸残基を表し；

H 4 及びH 5 は、独立して、アルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン又はグルタミン酸残基を表し；

H 6 は、プロリン、グリシン、オルニチン、リジン、アラニン、シトルリン、アルギニン又はグルタミン酸残基を表し；

20 H 7 は、プロリン、グリシン、オルニチン、リジン、アラニン、シトルリン又はアルギニン残基を表し；

H 8 は、チロシン、フェニルアラニン、アラニン、ナフチルアラニン、シトルリン又はグルタミン酸残基を表し；

H 9 は、グルタミン酸残基を表し；

25 H 1 0 は、シトルリン、グルタミン酸、アルギニン又はリジン残基を表し；

H 1 1 は、C末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、グルタミン酸、リジン又はシトルリン残基を表し；

上記式中、C y s はシステイン残基を表し、T y r はチロシン残基を表し、

4位と13位のシステイン残基はジスルフィド結合により連結していてもよく、アミノ酸はL体であってもD体であってもよい)で示されるペプチド又はその塩。

5 12. 下記式 (I i)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

I1-I2-I3-Cys-Tyr-I4-I5-I6-I7-I8-I9-I10-Cys-I11 (I i)

(式中、

I 1は、N末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン若しくはグルタミン酸残基であるか、又は欠失
10 しており；

I 2は、I 1がN末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン若しくはグルタミン酸残基である場合には、アルギニンまたはグルタミン酸残基を表し、I 1が欠失している場合には、N末端で誘導体化されていてもよいアルギニン又はグルタミン酸残基を表し；
15

I 3は、芳香族アミノ酸残基を表し；

I 4、I 5及びI 9は、独立して、アルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン又はグルタミン酸残基を表し；

20 I 6は、プロリン、グリシン、オルニチン、リジン、アラニン、シトルリン、アルギニン又はグルタミン酸残基を表し；

I 7は、プロリン、グリシン、オルニチン、リジン、アラニン、シトルリン又はアルギニン残基を表し；

25 I 8は、チロシン、フェニルアラニン、アラニン、ナフチルアラニン、シトルリン又はグルタミン酸残基を表し；

I 10は、グルタミン酸、アルギニン又はリジン残基を表し；

I 11は、C末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、グルタミン酸、リジン又はシトルリン残基を表し；

上記式中、C y sはシステイン残基を表し、T y rはチロシン残基を表し、

4位と13位のシステイン残基はジスルフィド結合により連結していてもよく、アミノ酸はL体であってもD体であってもよい)で示されるペプチド又はその塩。

5 13. 下記式 (I j)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

J1-J2-J3-Cys-Tyr-J4-J5-J6-J7-J8-J9-J10-Cys-J11 (I j)

(式中、

10 J1は、N末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン若しくはグルタミン酸残基であるか、又は欠失しており；

15 J2は、J1がN末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン若しくはグルタミン酸残基である場合には、アルギニンまたはグルタミン酸残基を表し、J1が欠失している場合には、N末端で誘導体化されていてもよいアルギニン又はグルタミン酸残基を表し；

J3は、芳香族アミノ酸残基を表し；

J4、J5及びJ9は、独立して、アルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン又はグルタミン酸残基を表し；

20 J6は、プロリン、グリシン、オルニチン、リジン、アラニン、シトルリン、アルギニン又はグルタミン酸残基を表し；

J7は、プロリン、グリシン、オルニチン、リジン、アラニン、シトルリン又はアルギニン残基を表し；

25 J8は、チロシン、フェニルアラニン、アラニン、ナフチルアラニン、シトルリン又はグルタミン酸残基を表し；

J10は、シトルリン、グルタミン酸、アルギニン又はリジン残基を表し；

J11は、C末端で誘導体化されていてもよいグルタミン酸、リジン又はシトルリン残基を表し；

上記式中、Cysはシステイン残基を表し、Tyrはチロシン残基を表し、4位と13位のシステイン残基はジスルフィド結合により連結していてもよく、アミノ酸はL体であってもD体であってもよい)で示されるペプチド又はその塩。

5

14. 以下の(1)～(58)のいずれかのペプチドまたはその塩:

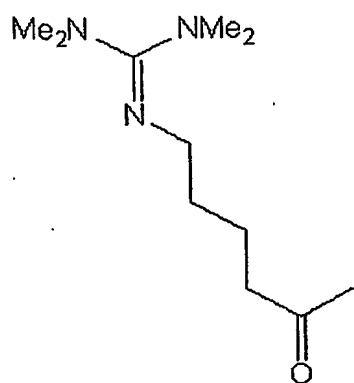
- (1) Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH;
- (2) Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH;
- (3) Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH;
- 10 (4) Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Cit-Cit-Cys-Arg-OH;
- (5) Ac-Cit-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH;
- (6) Ac-Cit-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH;
- (7) Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DCit-Pro-Tyr-Cit-Cit-Cys-Arg-OH;
- (8) Ac-Cit-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DLys-Pro-Tyr-Cit-Cit-Cys-Arg-OH;
- 15 (9) Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂;
- (10) Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Cit-Cit-Cys-Arg-NH₂;
- (11) Ac-Cit-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂;
- 20 (12) Ac-Cit-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂;
- (13) Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DCit-Pro-Tyr-Cit-Cit-Cys-Arg-NH₂;
- 25 (14) Ac-Cit-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DLys-Pro-Tyr-Cit-Cit-Cys-Arg-NH₂;
- (15) H-DGlu-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH;
- (16) H-Arg-Glu-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH;

- (17) H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Glu-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH ;
(18) H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Glu-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH ;
(19) H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH ;
(20) H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DLys-Pro-Tyr-Glu-Cit-Cys-Arg-OH ;
5 (21) H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Glu-OH ;
(22) H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;
(23) H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-DGlu-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;
10 (24) H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-DGlu-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;
(25) H-DGlu-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;
(26) H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-DGlu-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;
15 (27) H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-DGlu-Cys-Arg-NH₂ ;
(28) Ac-DGlu-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;
(29) Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-DGlu-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;
20 (30) Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-DGlu-Cys-Arg-NH₂ ;
(31) Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;
25 (32) guanyl-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;
(33) TMguanyl-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;

- (34) TMguanyl-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;
- (35) 4F-benzoyl-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;
- 5 (36) 2F-benzoyl-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;
- (37) APA-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;
- (38) desamino-R-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;
- 10 (39) guanyl-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;
- (40) succinyl-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;
- (41) glutaryl-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;
- 15 (42) deaminoTMG-APA-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;
- (43) nefinabiryl-succinyl-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;
- 20 (44) AZT-glutaryl-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;
- (45) R-CH₂-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;
- (46) H-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;
- (47) TMguanyl-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;
- 25 (48) ACA-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;
- (49) ACA-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH ;

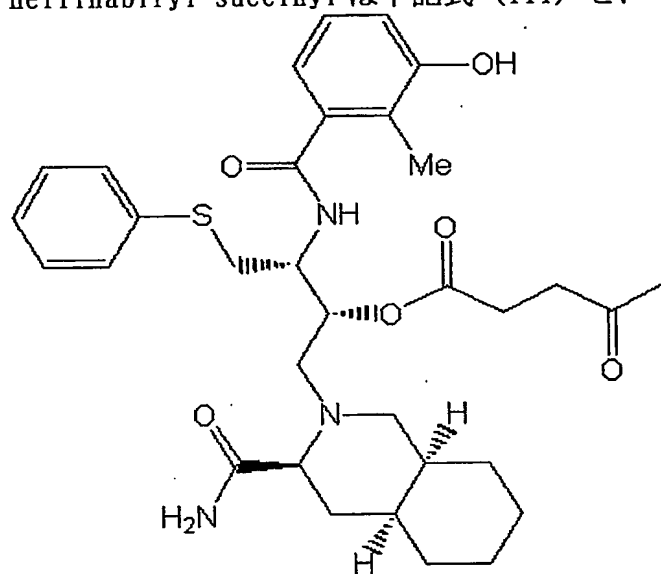
- (50) H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Arg-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;
- (51) Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Arg-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;
- 5 (52) Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;
- (53) Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ ;
- (54) 4F-benzoyl-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂
- 10 (55) 4F-benzoyl-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NHMe
- (56) 4F-benzoyl-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NHEt
- 15 (57) 4F-benzoyl-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NHiPr
- (58) 4F-benzoyl-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-tyramine

(各配列中、N末端アミノ酸の左の記号はアミノ基が誘導体化されているか、
20 またはされていないことを示し、Hは誘導体化されていないことを、Acはアセチル基を、guanylはグアニル基を、succinylはスクシニル基を、glutarylはグルタリル基を、TMguanylはテトラメチルグアニル基を、2F-beozoylは2-フルオロベンソイル基を、4F-benzoylは4-フルオロベンゾイル基を、APAは5-アミノペンタノイル基を、ACAは6-アミノヘキサノイル基を、
25 desamino-Rは2-デスアミノ-アルギニル基を、deaminoTMG-APAは下記式(II)を、



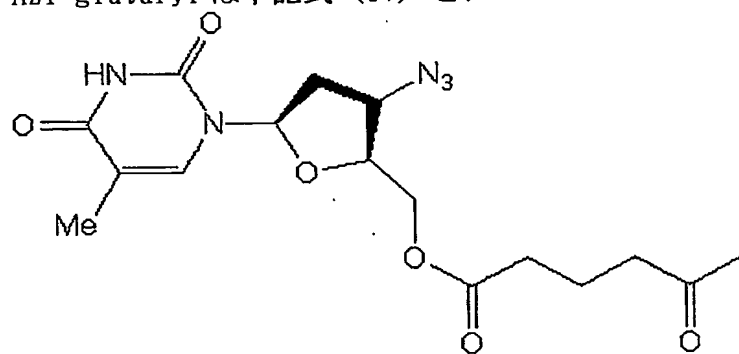
(II)

nelfinabiryl-succinyl は下記式 (III) を、



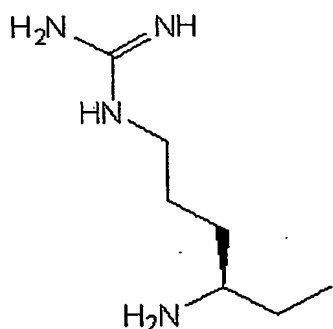
(III)

AZT-glutaryl は下記式 (IV) を、



(IV)

R-CH₂ は下記式 (V)



(V)

をそれぞれ示し、Arg は L-アルギニン残基を、Nal は L-3-(2-ナフチル)アラニン残基を、Cys は L-システイン残基を、Tyr は L-チロシン残基を、Cit は L-シトルリン残基を、Lys は L-リジン残基を、DLys は D-リジン残基を、Pro は L-プロリン残基を、DCit は D-シトルリン残基を、DGLu は D-グルタミン酸残基を、Glu は L-グルタミン酸残基をそれぞれ示し、2つのシステイン残基は分子内ジスルフィド結合により連結しており、C末端アミノ酸の右の記号はカルボキシル基が誘導体化されているか、またはされていないことを示し、OH は誘導体化されていないことを、NH₂ はアミノ基で、NMe はメチルアミノ基で、NEt はエチルアミノ基で、NiPr はイソプロピルアミノ基で、tyramine は p-ヒドロキシフェニルエチルアミノ基でアミド化されていることをそれぞれ示す)。

15 15. 請求項3～14のいずれかに記載のペプチド又はその塩を含有してなる医薬。

16. CXCR4拮抗剤である請求項15記載の医薬。

20 17. 癌または慢性関節リウマチの予防及び／又は治療剤である請求項15記載の医薬。

18. 癌種が乳癌または膵臓癌である請求項17記載の医薬。

19. 哺乳動物に対して請求項3～14のいずれかに記載のペプチド又はそ

の塩の有効量を投与することを特徴とする、癌または慢性関節リウマチの
予防・治療方法。

20. 癌または慢性関節リウマチの予防及び／又は治療剤を製造するため
5 の請求項3～14のいずれかに記載のペプチド又はその塩の使用。

21. 哺乳動物に対して下記式 (I a)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

A1-A2-A3-Cys-Tyr-A4-A5-A6-A7-A8-A9-A10-Cys-A11 (I a)

10 (式中、

A1は、N末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン若しくはグルタミン酸残基であるか、又は欠失しており；

15 A2は、A1がN末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン若しくはグルタミン酸残基である場合には、アルギニンまたはグルタミン酸残基を表し、A1が欠失している場合には、N末端で誘導体化されていてもよいアルギニン又はグルタミン酸残基を表し；

A3は、芳香族アミノ酸残基を表し；

20 A4、A5及びA9は、独立して、アルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン又はグルタミン酸残基を表し；

A6は、プロリン、グリシン、オルニチン、リジン、アラニン、シトルリン、アルギニン又はグルタミン酸残基を表し；

25 A7は、プロリン、グリシン、オルニチン、リジン、アラニン、シトルリン又はアルギニン残基を表し；

A8は、チロシン、フェニルアラニン、アラニン、ナフチルアラニン、シトルリン又はグルタミン酸残基を表し；

A10は、シトルリン、グルタミン酸、アルギニン又はリジン残基を表し；

A 1 1 は、C末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、グルタミン酸、リジン又はシトルリン残基を表し；

上記式中、C y s はシステイン残基を表し、T y r はチロシン残基を表し、
4位と13位のシステイン残基はジスルフィド結合により連結していてもよく、
5 アミノ酸はL体であってもD体であってもよい)で示されるペプチド又はその塩の有効量を投与することを特徴とする、癌または慢性関節リウマチの予防・治療方法。

22. 癌または慢性関節リウマチの予防及び／又は治療剤を製造するため
10 の下記式 (I a)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

A1-A2-A3-Cys-Tyr-A4-A5-A6-A7-A8-A9-A10-Cys-A11 (I a)

(式中、

A 1 は、N末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン若しくはグルタミン酸残基であるか、又は欠失
15 しており；

A 2 は、A 1 がN末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン若しくはグルタミン酸残基である場合には、アルギニンまたはグルタミン酸残基を表し、A 1 が欠失している場合には、N末端で誘導体化されていてもよいアルギニン又はグルタミン酸残基を表し；
20

A 3 は、芳香族アミノ酸残基を表し；

A 4、A 5 及び A 9 は、独立して、アルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン又はグルタミン酸残基を表し；

A 6 は、プロリン、グリシン、オルニチン、リジン、アラニン、シトルリン、アルギニン又はグルタミン酸残基を表し；
25

A 7 は、プロリン、グリシン、オルニチン、リジン、アラニン、シトルリン又はアルギニン残基を表し；

A 8 は、チロシン、フェニルアラニン、アラニン、ナフチルアラニン、シ

トルリン又はグルタミン酸残基を表し；

A 1 0 は、シトルリン、グルタミン酸、アルギニン又はリジン残基を表し；

5 A 1 1 は、C末端で誘導体化されていてもよいアルギニン、グルタミン酸、リジン又はシトルリン残基を表し；

上記式中、C y s はシステイン残基を表し、T y r はチロシン残基を表し、4 位と1 3 位のシステイン残基はジスルフィド結合により連結していてもよく、アミノ酸はL体であってもD体であってもよい）で示されるペプチド又はその塩の使用。

1 / 7

図 1

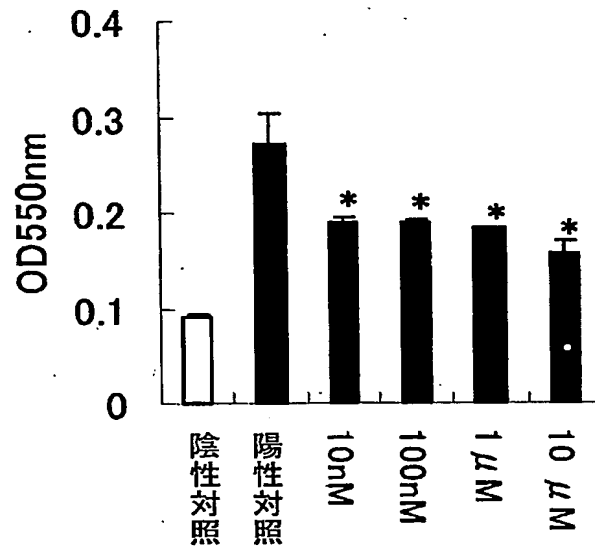
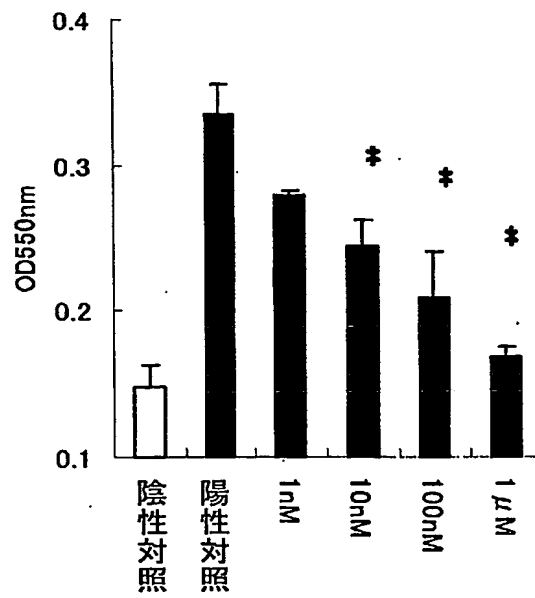


図 2



2/7

図 3

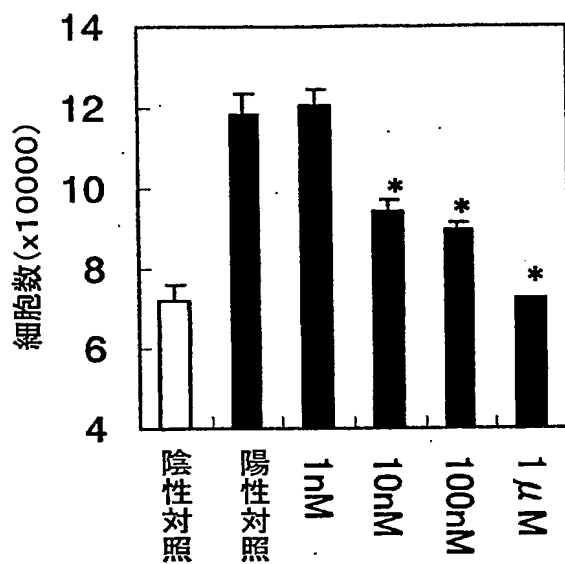
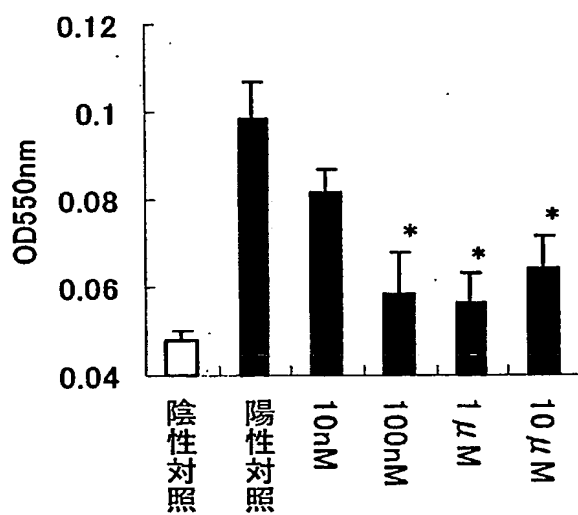


図 4



3 / 7

図 5 A

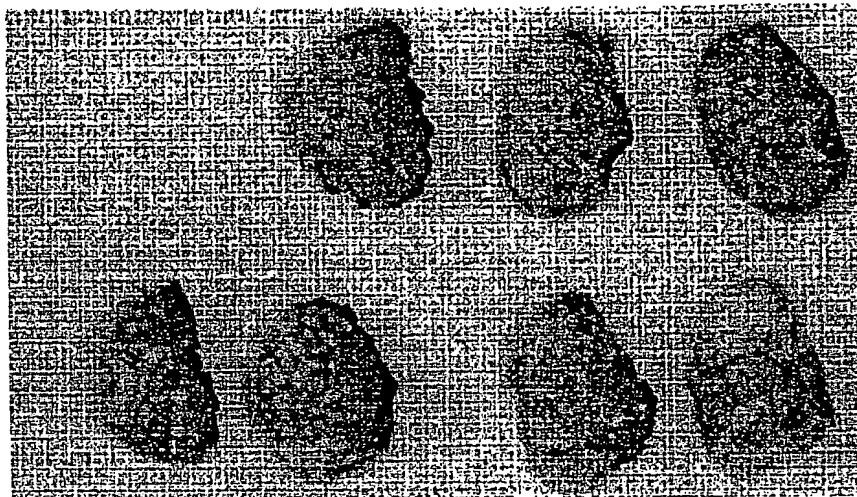
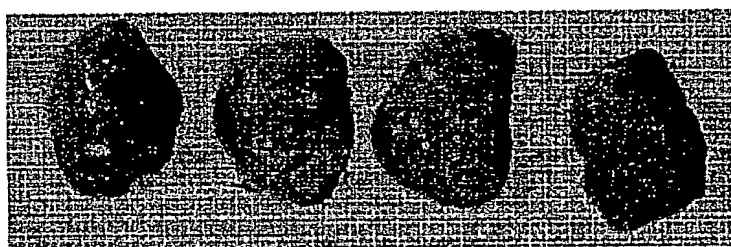


図 5 B



4 / 7

図 6

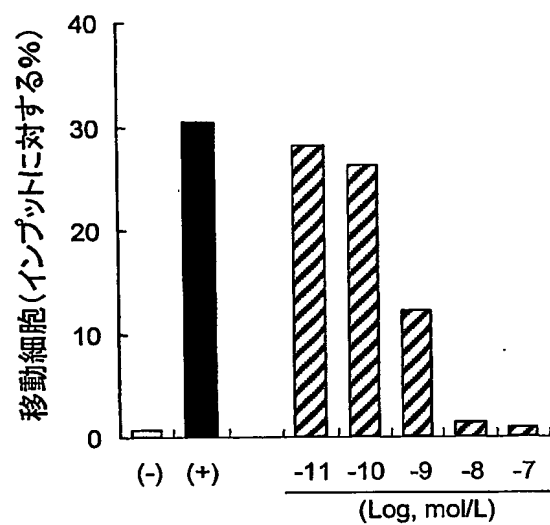
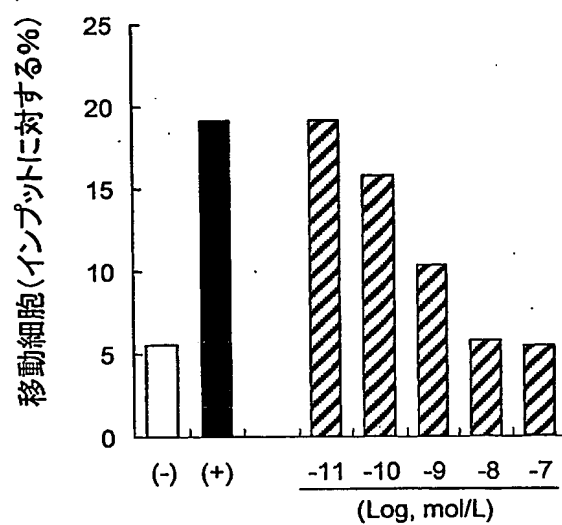
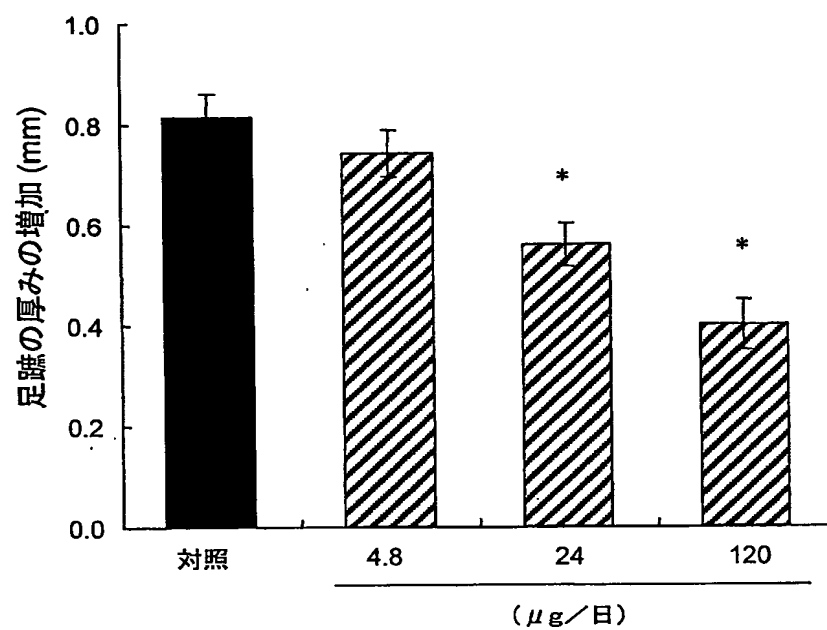


図 7



5 / 7

図 8



6/7

図 9A

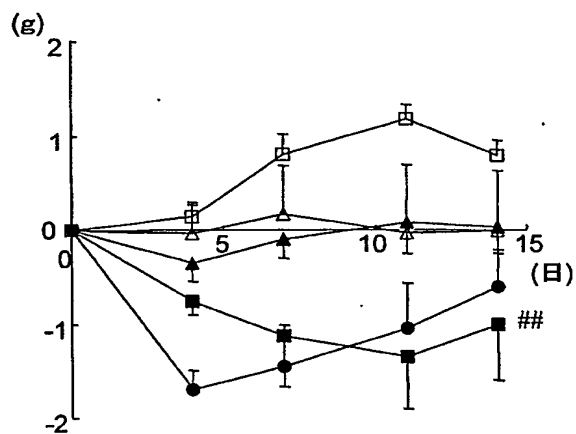


図 9B

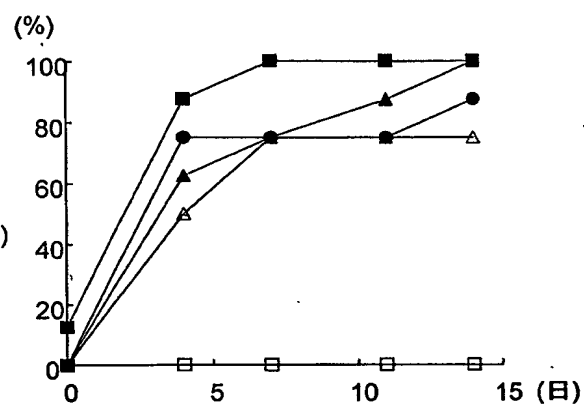


図 9C

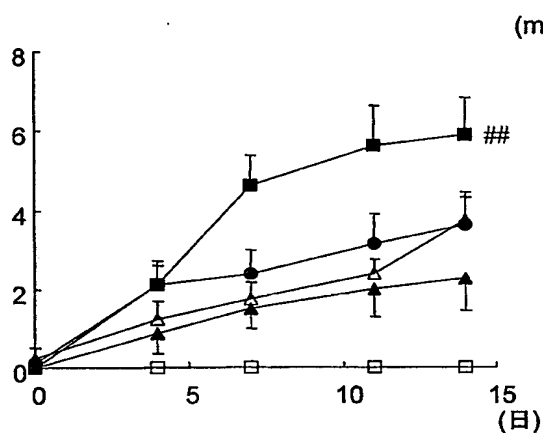


図 9D

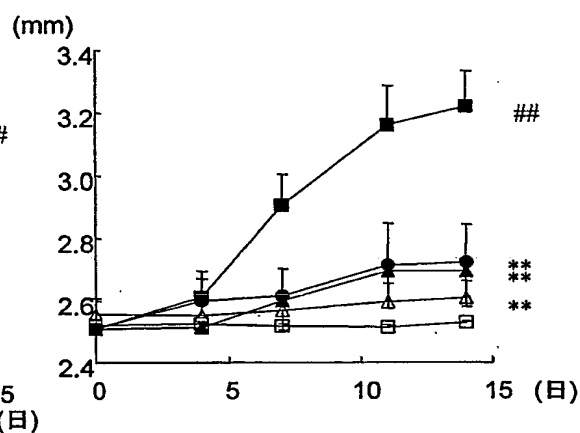


図 9E

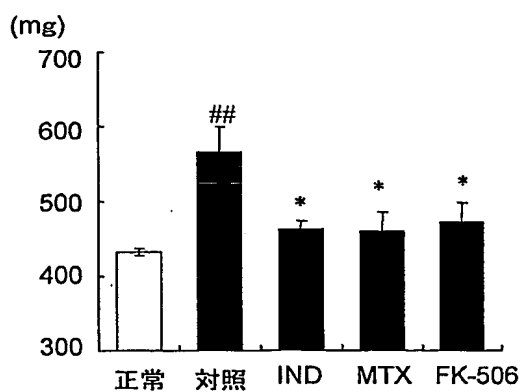
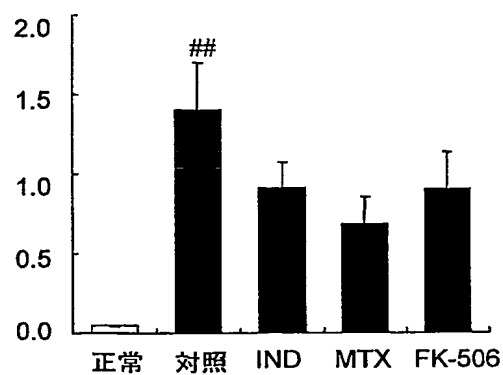


図 9F



7 / 7

図 1 0 A

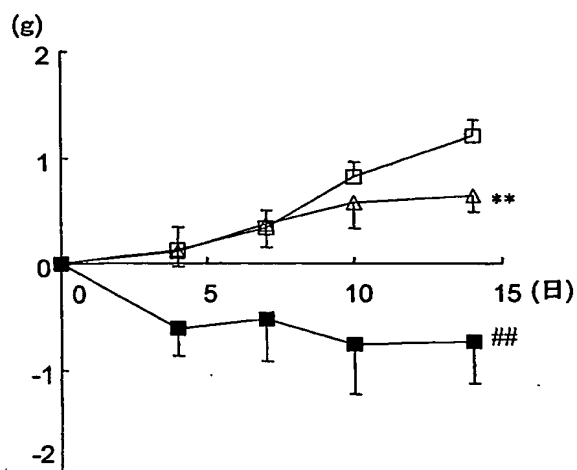


図 1 0 B

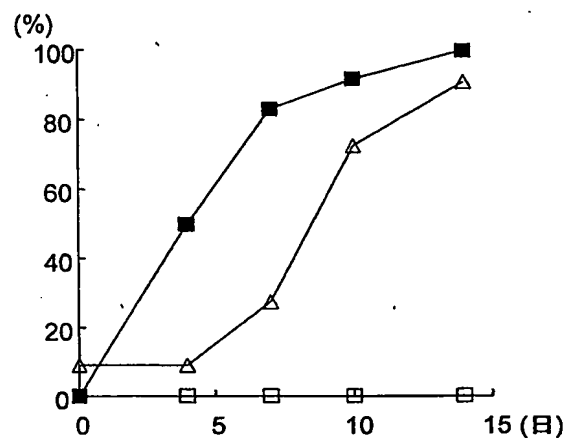


図 1 0 C

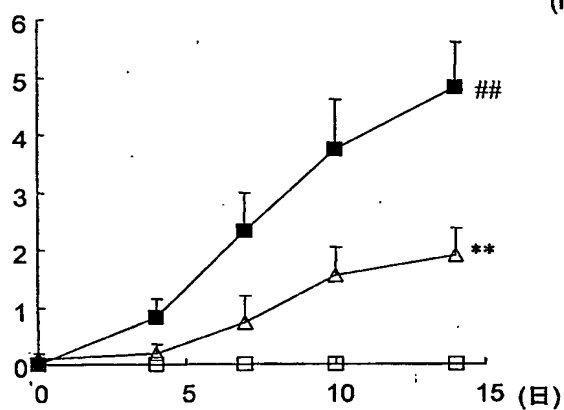


図 1 0 D

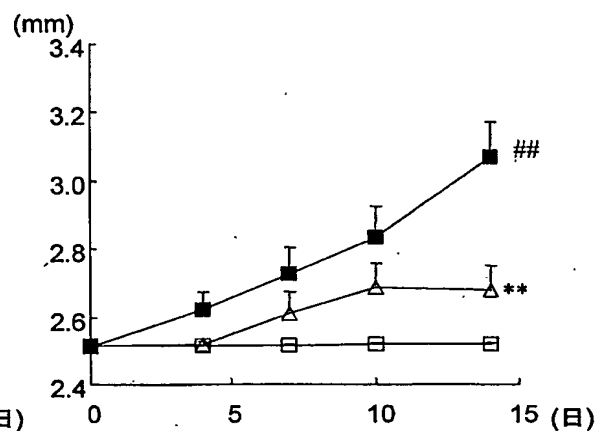


図 1 0 E

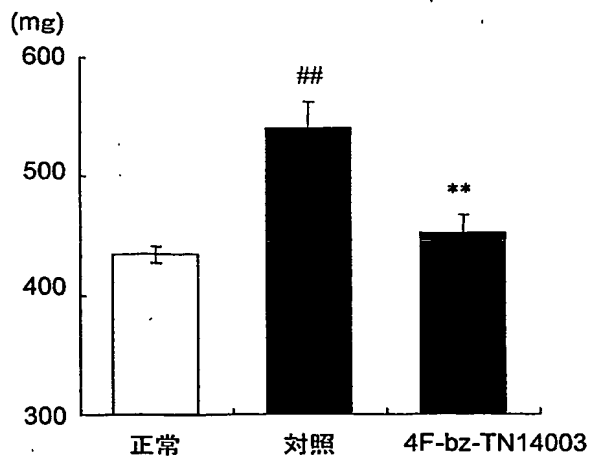
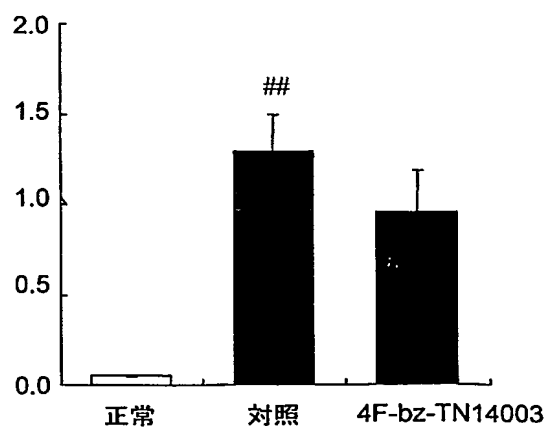


図 1 0 F



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10753

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K7/08, A61K38/00, A61P19/02, 29/00, 35/00, 35/04, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K7/08, A61K38/00, A61P19/02, 29/00, 35/00, 35/04, 43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TAMAMURA H. et al., Effective lowly cytotoxic analogs of an HIV-cell fusion inhibitor, T22 ([Tyr ^{5,12} , Lys ⁷]-polyphemusin II)., Bioorg.Med. Chem., 1998, Vol.6, No.2, pages 231 to 238	1-18,20,22
X	TAMAMURA H. et al., Efficient analogs of an anti-HIV peptide, T22([Tyr ^{5,12} , Lys ⁷]-polyphemusin II), having low cytotoxicity., Peptide Science, 1999, Vol.1997, pages 427 to 429	1-18,20,22
X	TAMAMURA H. et al., A Low-Molecular-Weight Inhibitor against the Chemokine Receptor CXCR4: A Strong Anti-HIV Peptide T140., Biochem.Biophys. Res.Comm., 1998, Vol.253, No.3, pages 877 to 882	1-18,20,22

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
23 October, 2003 (23.10.03)

Date of mailing of the international search report
04 November, 2003 (04.11.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/10753

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 02/20561 A1 (Seikagaku Corp.), 14 March, 2002 (14.03.02), & EP 1323730 A1	1-18, 20, 22